

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal



**Comportamentos alimentares de *Brachionus* spp:
microalgas vivas e liofilizadas e emulsões de produtos
comerciais.**

- Taxas de crescimento e análise dos conteúdos lipídicos

Ana Filipa Santos Lopes

Mestrado em Ecologia Marinha

2010

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal



**Comportamentos alimentares de *Brachionus* spp:
microalgas vivas e liofilizadas e emulsões de produtos
comerciais.**

- Taxas de crescimento e análise dos conteúdos lipídicos

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Vanda Brotas

Investigador Dr. Pedro Pousão-Ferreira

Ana Filipa Santos Lopes

Mestrado em Ecologia Marinha

2010

AGRADECIMENTOS:

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio do INRB, I.P./IPIMAR - Instituto de Investigação das Pescas e do Mar, onde foi realizada a componente prática e analítica do trabalho.

Os meus agradecimentos aos meus orientadores Professora Vanda Brotas (FCUL) e Doutor Pedro Pousão-Ferreira (IPIMAR) - a vossa ajuda e boa vontade foram bastante valiosos para ultrapassar as dificuldades.

Os meus agradecimentos à Doutora Narcisa Bandarra e à Dr.^a Joana Coutinho pelo auxílio e disponibilidade prestado nas análises lipídicas, à Dr.^a Ana Mendes e à Dr.^a Sara Castanho, pela revisão dos resultados.

Ao pessoal da Eppo (Estação Piloto de Piscicultura de Olhão), por me ajudarem sempre que precisei na preparação e construção dos ensaios, pelas boleias, pelos conselhos e à Rita pelos jantares e pelo ânimo.

Aos meus amigos Ana, André, Diana, Madalena, Pedro, Sandra, Sofia e Vasco, pelas incursões ao Algarve para me visitarem, pelo apoio quando tudo se complicava, e pela companhia nas madrugadas de trabalho e por me encorajarem a dar o meu melhor.

Por fim gostaria de agradecer à minha família, sempre me apoiou e exigiu de mim o máximo, porque sabiam que eu conseguia. Em particular aos meus pais, porque sem eles nada disto teria sido possível, não só pelo apoio financeiro e pela revisão do trabalho, mas sobretudo pelo apoio moral, pelos conselhos e pelo ânimo que me deram ao longo deste meu percurso escolar.

ABSTRACT

Brachionus sp. is a well-known and very important metazoan, used in aquaculture as live feeds for newly hatched marine fish larvae. As a filter feeder, *Brachionus* don't show food preference. However choosing the right diet for rotifers it is essential for its mass production and nutritional development, this is important since they transfer their nutrition values to the marine fish larvae. The aim of this study was to test some handmade mixtures with a potential commercial product and see the response of rotifers to it. Trials were set to different diets comparing a commercial product (ω 3yeast60) with mixtures of yeast, a freeze dried microalgae product and selenium or enrichment oils (Algatrium and Qrill). Rotifers fed with the commercial product ω 3yeast60 and with a mixture using enrichment oil Algatrium had a positive growth rate and also good incorporation values for HUFA. Filtration and grazing rate were also calculated to three important microalgae, since they are also an important food for live feeds. *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica* were tested at different cell concentrations. *Brachionus* showed a preference for *Nannochloropsis oculata*, with higher grazing values.

Key-words: *Brachionus*; microalgae; HUFA, filtration, grazing;

RESUMO

Brachionus sp. é uma conhecida espécie integrante do grupo metazoa, que desempenha um papel chave em aquacultura, mais concretamente na alimentação, nos estádio iniciais das larvas de peixes marinhos. Os rotíferos são organismos filtradores que não apresentam preferência no tipo de alimento. No entanto, a escolha da sua dieta é indispensável para o cultivo em grande escala e para o desenvolvimento nutricional, pois o conteúdo nutricional dos rotíferos é transferido para as larvas dos peixes marinhos. O objectivo deste estudo foi analisar a resposta dos rotíferos à alimentação, com diferentes dietas experimentais e um produto comercial. Ensaio foram realizados para comparar um produto comercial (ω 3yeast60) com misturas de levedura de padeiro, microalgas liofilizadas e selenium ou óleos de enriquecimento (Algatrium e Qrill). *Brachionus* sp. alimentado com ω 3yeast60 e a mistura com o óleo Algatrium, apresentou uma taxa de crescimento positiva e bons níveis de incorporação dos HUFA. Taxas de filtração e herbivoria foram também calculadas, uma vez que estas desempenham um papel importante na alimentação dos rotíferos. *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica* foram testadas em diferentes concentrações. Valores elevados da taxa de herbivoria mostraram que *Brachionus* apresenta preferência por *Nannochloropsis oculata*.

Palavras-chave: *Brachionus*; microalgas; HUFA; filtração; herbivoria

Parte deste trabalho foi apresentado na Conferência Europeia de Aquacultura 2010 em formato poster.

“Feeding behavior of *Brachionus* sp.: filtration and grazing rates with different microalgae”, este teve como autores Ana Lopes, Sara Castanho, Ana Mendes, Vanda Brotas e Pedro Pousão-Ferreira

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 – Estado da arte: aquacultura	1
1.2 – Produção de microalgas	3
1.2.1 - Crescimento	5
1.2.2 - Condições físicas e químicas da produção de microalgas	6
1.2.3 - Valor Nutricional	7
1.2.4 - Produção intensiva	8
1.3 - Produção e valor nutricional dos rotíferos	11
1.3.1 - Biologia e morfologia	11
1.3.2 - Taxonomia	12
1.3.3 - O cultivo de rotíferos	13
1.3.4 – Valor nutricional dos rotíferos	17
2 – OBJECTIVOS	18
3 – METODOLOGIA	19
3.1 – Cultivo de microalgas	19
3.2 – Selenium e óleos de enriquecimento	20
3.2.1 – Pré-ensaios	20
3.2.2 – Ensaios 1 e 2	22
3.3 – Análise de ácidos gordos	23
3.4 – Taxas de filtração e herbivoria	24
3.5 – Contagem	26
3.6 – Tratamento estatístico	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 - Selenium e óleos de enriquecimento	27
4.1.1 – Pré-ensaios	27
4.1.2 – Ensaios 1 e 2	27
4.1.3 – Ácidos gordos	31
4.2 – Filtração e herbivoria	38
5 – CONCLUSÃO	43
6 – ANEXOS	46
7 – BIBLIOGRAFIA	50

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - ESTADO DA ARTE: AQUACULTURA

A indústria da aquacultura desempenha um papel essencial na economia global. Alimentando milhares de pessoas em todo o mundo, esta indústria é um bom exemplo da capacidade do Homem em aplicar o conhecimento biológico de forma a obter benefícios económicos e biológicos (Kaiser 2005).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial de aquacultura teve um crescimento drástico nos últimos 50 anos. No início dos anos 50 a produção era menos de um milhão de toneladas, em 2006 esta produção atingiu os 21,7 milhões de toneladas. Este aumento indica que a indústria da aquacultura está a crescer de forma mais rápida que outros sectores de produção animal. (FAO, 2009). Ainda de acordo com a FAO, as taxas de crescimento anuais no sector da aquacultura entre 2004 e 2006 foram de 6,1% em termos de volume. Na figura 1 observa-se que este crescimento da indústria de aquacultura, em diferentes regiões do globo, não tem sido uniforme, e divide-se em sete grandes grupos, como se observa na figura 2: plantas aquáticas, peixes de água doce, moluscos, peixes diádromos, crustáceos, peixes marinhos e outros animais aquáticos que não se incluem em nenhum outro grupo. As plantas aquáticas são o grupo que apresenta os maiores valores de produção a nível mundial, com uma taxa de crescimento anual de 8%, em 2006 a produção foi de 15,1 milhões de toneladas (FAO, 2009)

Actualmente a investigação na área da aquacultura está dividida em três grandes categorias: a) melhoramento na produção das espécies existentes; b) desenvolvimento de métodos de cultura para novas espécies; c) maximização da probabilidade de sobrevivência de peixes de cativeiro, quando libertados na natureza. Ao longo deste trabalho vão ser enfatizados os melhoramentos na produção de espécies existentes, através da investigação de um nível de nutrição adequado para alimento vivo, mais especificamente para *Brachionus* sp.

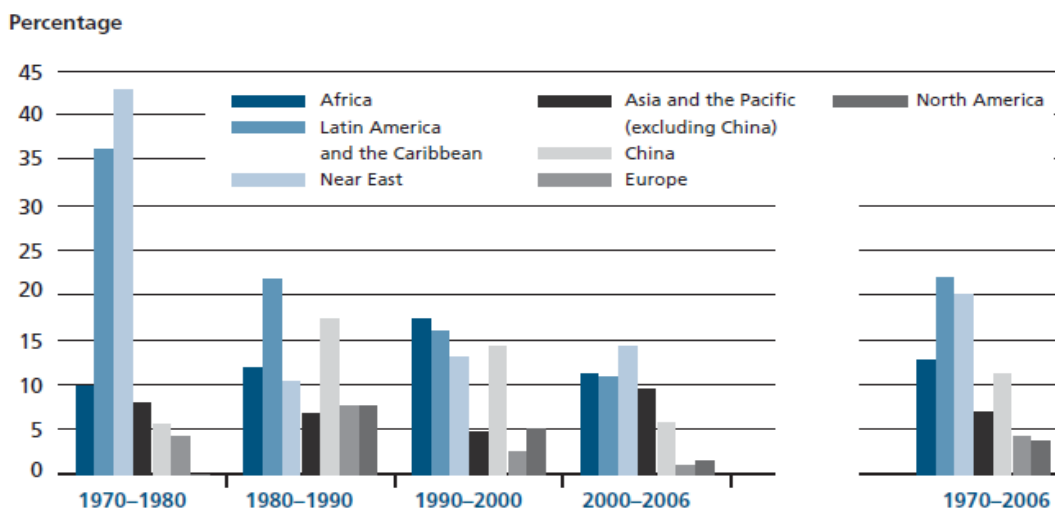


Figura 1 – Taxa de crescimento da produção de aquacultura em várias regiões do globo entre 1970 e 2006. A América latina e Caraíbas apresentam o maior crescimento anual (22%), seguido do Próximo Oriente, África e China com 20%, 12,7% e 11,2% (respectivamente). As regiões com a taxa anual de crescimento mais baixa, a Europa e América do Norte apresentam uma descida considerável desde o ano 2000. *fonte: The State of World Fisheries and Aquaculture*

Nota: Estes dados excluem a produção de plantas aquáticas.

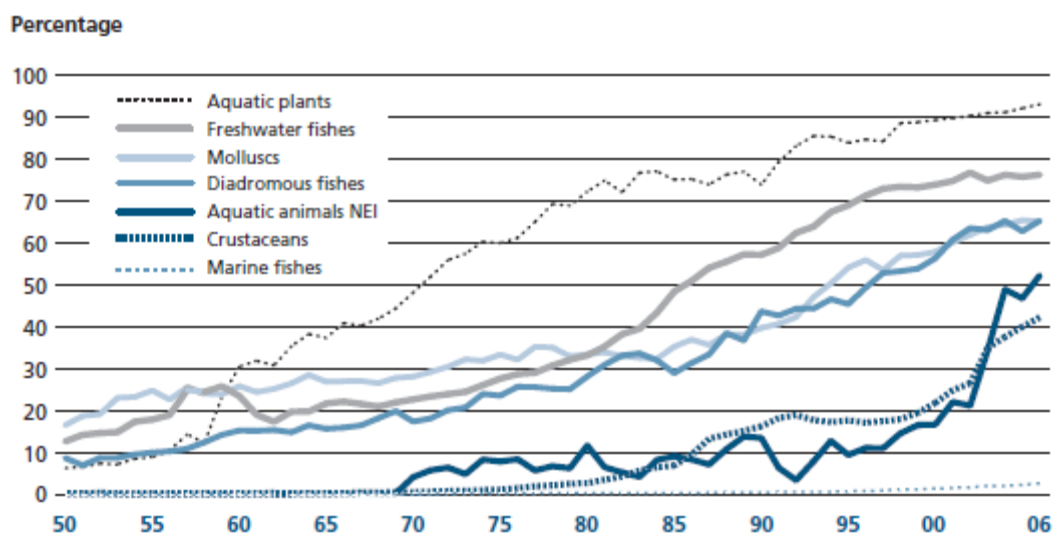


Figura 2 – Contribuição dos maiores grupos de espécies na produção global da aquacultura. A produção de plantas aquáticas atinge os maiores valores, enquanto os peixes marinhos são dos grupos com menor relevo no panorama geral *fonte: The State of World Fisheries and Aquaculture*.

Nota: NEI – não incluídas noutro grupo

1.2 - PRODUÇÃO DE MICROALGAS EM AQUACULTURA

O fitoplâncton, constituído por microalgas, desempenha um papel muito relevante na cadeia trófica marinha. Estima-se que a produção anual do fitoplâncton do planeta seja de aproximadamente 48 Pg de carbono (Field *et al.*, 1998).

As microalgas são organismos unicelulares e fotossintéticos, com dimensões que variam entre 2µm a 100µm e que podem estar organizadas em colónias ou células individuais (Coutteau, 1996). Alguns organismos possuem flagelos e utilizam-nos para a locomoção (Graham & Wilcox, 2000). Estes organismos desempenham um papel chave na aquacultura sendo utilizadas como alimento em todos os estádio de crescimento de bivalves e moluscos, em alguns estádio larvares e juvenis de crustáceos e peixes, e também para a alimentação de zooplâncton. As maternidades (“hatcheries”) necessitam de um processo de produção de microalgas para o desenvolvimento dos sistemas de alimento vivo (Muller-Feuga, 2000). O metabolismo destes organismos envolve numerosos componentes bioquímicos com interesse em variadas indústrias (cosmética, farmacêutica, nutrição). A plasticidade metabólica de algumas espécies é particularmente importante na capacidade de sintetizar ácidos gordos polinsaturados (PUFA), que são benéficos para os animais, (Muller-Feuga *et al.*, 2003) o que, por sua vez, permite que as microalgas possam colonizar diversos ambientes.

A primeira espécie de microalgas a ser usada em aquacultura foi escolhida a partir das que se desenvolvem naturalmente no meio marinho e que, supostamente, seria mais fácil de cultivar. Posteriormente outras espécies foram estudadas de modo a serem escolhidas as que nutricionalmente se revelaram mais eficientes para a produção em larga escala (Muller-Feuga, *et al.*, 2003). Actualmente, algumas dessas espécies são amplamente utilizadas como se observa na tabela 1 (Pousão-Ferreira, 2009).

A escolha das microalgas utilizadas em aquacultura, está relacionada com as características que favorecem o crescimento e sobrevivência dos organismos filtradores. Porém, nem todas as microalgas têm o mesmo efeito nos diferentes organismos, o tamanho, facilidade de serem produzidas em grandes quantidades,

digestibilidade e o valor nutricional são algumas das características importantes na escolha da espécie a utilizar (Coutteau, 1996). Contudo, como a produção de microalgas é um processo complexo e dispendioso, a tendência actual é evitar o uso de microalgas vivas, substituindo-as por leveduras e dietas bioencapsuladas. Contudo sabe-se que, em numerosas circunstâncias, as algas vivas são essenciais para o desenvolvimento e reprodução dos organismos (Borowitzka, 1997; Muller-Feuga, 2000).

Tabela 1 – Principais espécies de microalgas utilizadas em aquacultura. Legenda: A – *Artemia* spp; B – Bivalves; C – Outros Crustáceos; Cp – Copépodes; R – Rotíferos. *fonte: Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos*

Género/ Espécie	Dimensão (μm)	Cor	Mobilidade	Temp. Óptima	Salinidade	Concent. Celular ($10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)	Espécies consumidoras
<i>Tetraselmis suecica</i>	6-7	verde	sim	20-28°C	25-35	2-5	A; B; C; R
<i>Dunaliella tertioleta</i>	4-5	verde	sim	12-30°C	-	2	A; B; R
<i>Chlorella</i> spp.	2-4	verde	não	<28°C	>5	50	A; R
<i>Nannochloropsis</i> sp.	1-4	verde	não	<28°C	5-35	50	A; C; Cp; R
<i>Isochrysis galbana</i>	3	castanha	sim	18-20°C	10-35	5-15	A; B; C; R
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	5	castanha	sim	18-26°C	25-35	10-20	A; B; C
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	4-5	castanha	não	25-30°C	25-35	5	A; B; C
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	12-40	castanha	não	-	-	-	B; C
<i>Skeletonema costatum</i>	5-8 forma uma cadeia	castanha	não	10-27°C	<30	3	B; C

1.2.1 - Crescimento

O crescimento das microalgas deve-se ao aumento do tamanho e à divisão das células. A sua produção é iniciada por culturas de inóculo (também chamadas de “stock”) que são conservadas de forma asséptica, para manter as células em boas condições mas com crescimento mínimo. Os volumes de stock são usados na manutenção de estirpes puras, e também no fornecimento de inóculos para a produção de grandes volumes (Pousão-Ferreira, 2009). Segundo Coutteau (1996), as microalgas apresentam cinco fases de crescimento (figura 3):

- Fase de latência (1) corresponde à fase de adaptação das algas ao meio. Esta ocorre quando as células mudam de um meio sólido para meio líquido ou de um volume menor para um volume maior.
- Fase exponencial (2) corresponde ao máximo de multiplicação das células. O crescimento nesta fase aumenta em função do tempo. A função que representa este crescimento é $Ct = C0 \cdot e^{mt}$ Ct e $C0$ são as concentrações de células no tempo t e 0 respectivamente e m é uma taxa de crescimento específica. O crescimento específico depende da temperatura, luz e da espécie de alga.
- Fase de desaceleração (3) imediatamente anterior à fase estacionária, nesta a divisão celular começa a diminuir quando os nutrientes, pH, luz, dióxido de carbono ou outros factores químicos e físicos começam a limitar o crescimento.
- Fase estacionária (4) ocorre quando a concentração máxima de células é atingida. O número de células permanece o mesmo até se esgotarem os nutrientes. A duração desta fase depende das espécies. Nesta fase as algas têm a sua concentração máxima de lípidos e devem ser, por isso, administradas ao alimento vivo.

➤ Fase de declínio (5) após o consumo total dos nutrientes a reprodução cessa e a cultura acaba por morrer. A sua capacidade nutritiva é bastante inferior e não deve ser usada como alimento.

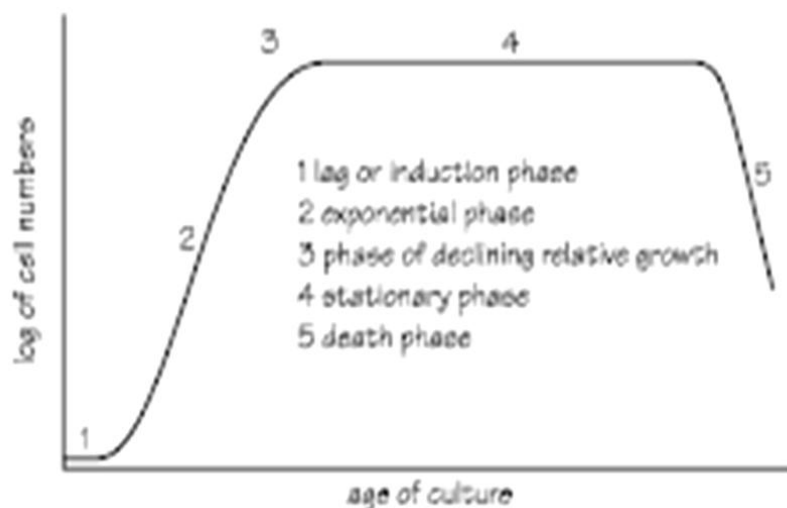


Figura 3 – As cinco fases de crescimento das culturas de microalgas fonte: *Manual on the production and use of live food for aquaculture*.

1.2.2 - Condições físicas e químicas da produção de microalgas

Luminosidade

A luz é a fonte de energia para a realização de fotossíntese. A intensidade luminosa necessária depende da densidade da cultura. Assim, maiores densidades de microalgas necessitam de maiores intensidade luminosas que penetrem por entre a cultura. As culturas de fitoplâncton conseguem desenvolver-se normalmente sob iluminação constante. A luz pode ser natural ou fornecida artificialmente, contudo, intensidade luminosa em demasia pode provocar a fotoinibição das microalgas.

Salinidade

As espécies marinhas de fitoplâncton, entre as quais se encontram a maior parte das algas utilizadas em aquacultura, têm uma elevada tolerância a diferenças na salinidade. Grande parte das espécies cresce melhor se aquela for um pouco menor do que no seu habitat natural (tabela1).

Temperatura

Para a maior parte das espécies de microalgas utilizadas em aquacultura mediterrânica, a temperatura óptima para culturas de fitoplâncton encontra-se entre 20º e os 24ºC, no entanto esta varia com a composição da cultura, a espécie e estirpe da microalga. As espécies mais comuns suportam temperaturas entre os 16 e os 28ºC (tabela 1). Abaixo deste valor o crescimento é muito lento, e valores superiores a 28ºC são letais para os organismos. As salas de produção de microalgas são, consequentemente, ambientes de temperatura controlada.

pH

Os valores de pH devem situar-se entre 7,5 e 9, no entanto o valor ideal está próximo de 8-8,5. O colapso das culturas devido à interrupção de processos celulares pode dever-se à incapacidade de manter um valor de pH aceitável. Este tem a tendência a aumentar com a concentração e idade da cultura, tornando-se limitante para o crescimento das células. A adição de dióxido de carbono permite corrigir o pH e mantê-lo dentro dos valores limite (Pousão-Ferreira, 2009).

Arejamento

O arejamento das culturas de microalgas é indispensável para evitar a sedimentação das células, e garantir que a população é exposta à luz e nutrientes de forma igual e evitar a estratificação térmica em tanques de grande volume. O arejamento também favorece as trocas gasosas com o ambiente. No entanto há espécies de microalgas que não aguentam o arejamento demasiado forte, podendo até ser prejudicial para o seu desenvolvimento (ex: *Tetraselmis suecica* pode perder os flagelos se o arejamento for muito forte) (Muller-Feuga, *et al*, 2003)

1.2.3 - Valor Nutricional

O valor nutricional de qualquer espécie de microalga depende de diferentes factores como: a) tamanho das células; b) digestibilidade; c) produção de componentes tóxicos; d) composição bioquímica das algas (exemplo: nutrientes,

enzimas, toxinas) (Brown, 2002) e pode modificar-se com diferentes condições das culturas (Enright et al., 1986a; Brown et al., 1997). Proteínas, lípidos e carbo-hidratos estão presentes em todas as espécies de microalgas, diferindo apenas na quantidade de cada nutriente. Na tabela 2 são analisadas as espécies mais usadas em aquacultura. Nesta tabela observa-se que as microalgas têm diferenças de valores entre os nutrientes, contudo, as proteínas são o componente com maior representação seguido pelos lípidos e carbo-hidratos, em percentagem de peso seco. O valor destes diferentes nutrientes tem intervalos de 12-35%, 7,2-23% e 4-26% respectivamente (Coutteau, 1996). As microalgas são nutricionalmente ricas em ácidos gordos altamente insaturados (HUFAs). O conteúdo destes, particularmente o ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA), o ácido araquidónico (20:4n-6, ARA) e o ácido decosaheptaenoico (22:7n-3, DHA), são de extrema relevância na composição de espécies zooplânctónicas (como rotíferos e artémia) usadas como alimento vivo para as larvas de peixes marinhos (FAO, 1996).

1.2.4 - Produção intensiva

A produção de microalgas é feita em duas fases: a preparação e manutenção dos inóculos puros (também denominados de “stocks”); a preparação e manutenção de grandes volumes.

Através de um sistema fechado de cultivo, sistema *batch*, as células são mantidas num volume limitado de água salgada e nutrientes. O volume inicial é igual ao volume final, a fase exponencial do crescimento destes organismos dura vários dias, dependendo da espécie e da quantidade de inóculo colocado no volume total. Quando atinge a sua densidade máxima, antes da fase estacionária, as microalgas são recolhidas e usadas para inocular volumes sucessivamente maiores, até que seja atingida a concentração desejada (Coutteau, 1996).

Tabela 2 – Concentrações de clorofila a, proteínas, carbo-hidratos e lípidos em 16 espécies de microalgas usadas em aquacultura (modificado de Brown, 1991).Fonte: *Manual on the production and use of live food for aquaculture*

Algal class Species	Dry weight (pg.cell ⁻¹)	Chl a	Protein	Carbo- hydrate	Lipid
Weight of constituent (pg.cell ⁻¹)					
Bacillariophyceae					
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	11.3	0.34	3.8	0.68	1.8
<i>Chaetoceros gracilis</i>	74.8	0.78	9.0	2.0	5.2
<i>Nitzschia closterium</i>	-	-	-	-	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	76.7	0.41	23.0	6.4	10.7
<i>Skeletonema costatum</i>	52.2	0.63	13.1	2.4	5.0
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	28.4	0.27	9.7	2.5	5.5
Chlorophyceae					
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	99.9	1.73	20.0	12.2	15.0
<i>Nannochloris atomus</i>	21.4	0.080	6.4	5.0	4.5
Cryptophyceae					
<i>Chroomonas salina</i>	122.5	0.98	35.5	11.0	14.5
Eustigmatophyceae					
<i>Nannochloropsis oculata</i>	6.1	0.054	2.1	0.48	1.1
Prasinophyceae					
<i>Tetraselmis chui</i>	269.0	3.83	83.4	32.5	45.7
<i>Tetraselmis suecica</i>	168.2	1.63	52.1	20.2	16.8
Prymnesiophyceae					
<i>Isochrysis galbana</i>	30.5	0.30	8.8	3.9	7.0
<i>Isochrysis</i> aff. <i>Galbana</i> (T-Iso)	29.7	0.29	6.8	1.8	5.9
<i>Pavlova lutheri</i>	102.3	0.86	29.7	9.1	12.3
<i>Pavlova salina</i>	93.1	0.34	24.2	6.9	11.2
Percentage of dry weight					
Bacillariophyceae					
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	11.3	3.01	34	6.0	16
<i>Chaetoceros gracilis</i>	74.8	1.04	12	4.7	7.2
<i>Nitzschia closterium</i>	-	-	26	9.8	13
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	76.7	0.53	30	8.4	14
<i>Skeletonema costatum</i>	52.2	1.21	25	4.6	10
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	28.4	0.95	34	8.8	19
Chlorophyceae					
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	99.9	1.73	20	12.2	15
<i>Nannochloris atomus</i>	21.4	0.37	30	23.0	21
Cryptophyceae					
<i>Chroomonas salina</i>	122.5	0.60	29	9.1	12
Eustigmatophyceae					
<i>Nannochloropsis oculata</i>	6.1	0.89	35	7.8	18

Este método permite minimizar o risco de contaminação, devido ao uso de volumes independentes para a inoculação e também à sua fácil execução (Pousão-Ferreira, 2009). Os volumes e inóculos são armazenados em diferentes locais, de acordo com as suas especificidades, e mantidos entre 18º e 20ºC. Os inóculos sólidos são incubados sob uma iluminação fraca mas contínua, num local refrigerado. Os líquidos, por sua vez, são cobertos com algodão cardado autoclavado e colocados de parte sem arejamento, apenas com uma pequena agitação diária. Os inóculos iniciais,

que são também armazenados em material previamente autoclavado, são mantidos deste modo, para baixar ao máximo o metabolismo dos organismos e manter os inóculos puros e em perfeitas condições.

A produção em grande escala é feita dentro de salas, em clima controlado; ou em estufas, em épocas do ano que permitam manter o clima controlado; ou ao ar livre, sempre que o clima e a região o permitam. Neste último é maior a probabilidade de contaminações. A primeira fase é denominada cultivo sem reposição ou *batch*, depois desta segue-se uma cultura de volumes intermédios que vai permitir a inoculação de grandes volumes, necessários para a produção intensiva, como se observa na figura 4 (Pousão-Ferreira, 2009).

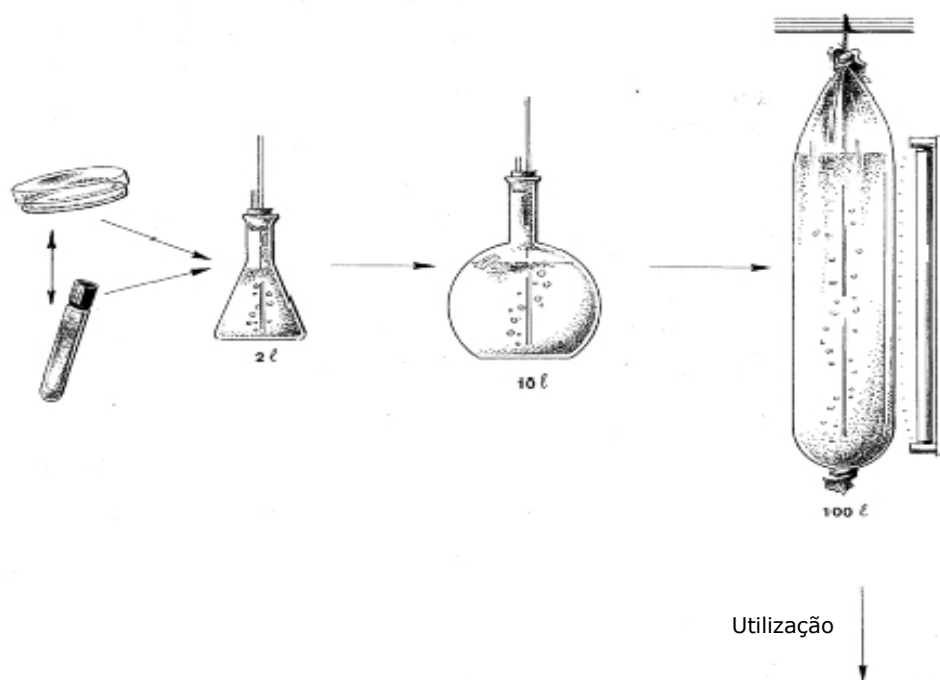


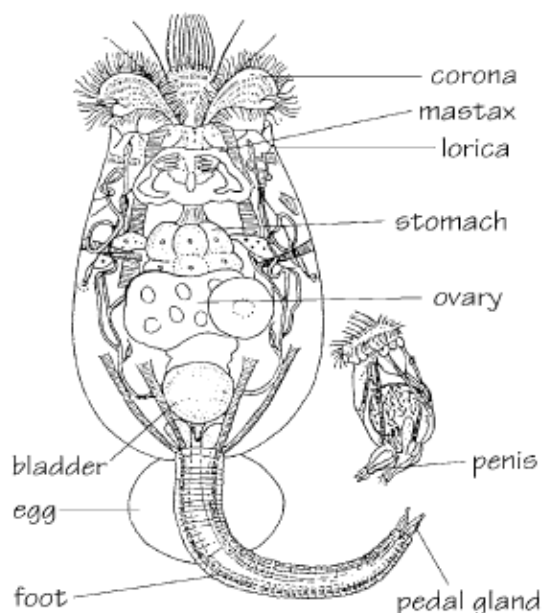
Figura 4 - Esquema de produção de microalgas (desenho de J.J.Sá e Silva, fonte: *Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos*)

1.3 - PRODUÇÃO E VALOR NUTRICIONAL DOS ROTÍFEROS

1.3.1 - Biologia e morfologia

Rotífera é um pequeno grupo de organismos aquáticos pseudocelomados, invertebrados e não segmentados que integra o grupo dos metazoários. Existem espécies de águas doces, marinhas e salobras. Os rotíferos apresentam uma coroa anterior apical ciliada, usada no seu deslocamento e na sua alimentação; os cílios possuem a capacidade de realizar movimentos metacoronais. Estas características permitem a distinção de outros metazoários. (Lubzens & Zmora, 2003).

Os rotíferos têm três regiões distintas: a cabeça, que suporta a coroa ciliada; o corpo e o pé como se observa na figura 5 (Dhert, 1996). Neste, podem ser encontradas glândulas secretoras de um muco que permite a ligação provisória dos organismos ao substrato. O corpo dos rotíferos está coberto por uma cutícula extracelular, a lórica. A forma desta e o comprimento das espículas permite a distinção entre várias espécies (Yufera 2001).



A captura do alimento é feita através dos cílios da coroa (como referido), e do mastax. Embora sejam organismos filtradores, estes aparentam ter poucas preferências no alimento, uma vez que conseguem reproduzir-se quando alimentados com diferentes espécies de alga, levedura ou até bactérias (Hansen *et al.* 1997).

Figura 5 – organização interna e morfológica de *Brachionus* spp. fêmea (esquerda) e macho (direita). Modificado por Koste 1980, fonte: *Manual on the production and use of live food for aquaculture*

No entanto, estudos indicam que com determinados tipos de alimento se consegue obter melhores taxas de crescimento, e que existe uma selectividade

baseada no tamanho da presa (Hansen *et al.* 1997). Quando o alimento é alga, é necessário ter também em conta que a sua dimensão depende da superfície da célula, das condições fisiológicas e da mobilidade das algas (Hansen *et al.* 1997).

Os rotíferos alimentam-se das partículas disponíveis na coluna de água. Tradicionalmente os rotíferos são alimentados com a) microalgas (nomeadamente *Nannochloropsis* spp, *Nannochloris* spp, *Tetraselmis* spp, *Isochrysis galbana*), b) levedura (a mais comum *Saccaromyces cereviceae*, também conhecida como levedura de padeiro) c) emulsões d) microalgas liofilizadas e pastas concentradas (Dhert *et al.*, 2001; Lubzens & Zmora, 2003). Como referido, algumas destas dietas favorecem o crescimento em grandes quantidades, enquanto outras fornecem aos rotíferos conteúdos nutricionais que estes não possuem e que vão ser importantes para as larvas de peixes marinhos que se alimentam destes organismos.

Morfologicamente, fêmeas e machos são bastante distintos. As primeiras são sempre diplóides e têm um maior comprimento quando comparados com os machos, que são haplóides. Os machos são nutricionalmente inferiores às fêmeas, e na natureza, quase todos os rotíferos são fêmeas. O aumento da população é feito por partenogénese. Ocasionalmente ocorre reprodução sexuada, dependendo das condições da população (Lubzens & Zmora, 2003).

1.3.2 - Taxonomia

Anteriormente foram evidenciadas características, que distinguem o grupo Rotifera de outros metazoários, mais particularmente ao nível do género *Brachionus*. A forma do corpo ovalado e achatado dorsoventralmente e a lórica com seis espículas, na borda anterior dorsal, distinguem este género dos outros.

Apenas algumas espécies de *Brachionus* são utilizadas na aquacultura, *Brachionus plicatilis* é a espécie mais usada a nível mundial, no entanto existe outra espécie que é normalmente considerada, *Brachionus rotundiformis*. Durante algum tempo ambas as espécies foram consideradas como duas estirpes de uma só espécie (estripe L – *B. plicatilis* e estripe S – *B. rotundiformis*). Após o desenvolvimento de

métodos moleculares foi possível separar estas duas espécies geneticamente. Além desta distinção genética, as duas espécies apresentam também diferenças morfológicas. *B. plicatilis* tem maiores dimensões: uma lórica mais alongada, e maior tolerância a temperaturas inferiores a 20°C, enquanto *B. rotundoformis* tem a sua taxa de crescimento óptima acima dos 20°C (Pousão-Ferreira, 2009).

Segundo Baer *et al* (2008) a designação *Brachionus plicatilis*, refere-se, actualmente, a um complexo grupo multi-específico que engloba as espécies anteriormente referidas e também *Brachionus ibericus* e *Brachionus manjavacas*, juntamente com uma série de linhagens que são perceptíveis por métodos moleculares. Na bibliografia e na prática os termos *L* e *S* continuam a aparecer para identificar as diferentes estirpes, referindo-se ao tamanho relativo do seu corpo (Conceição *et al*, 2010). A estirpe *S*, devido à sua dimensão, é mais adequada aos primeiros estádios larvares de alguns peixes, sendo gradualmente substituída pela estirpe *L*. Quando as espécies aparecem misturadas numa cultura é possível separá-las usando temperaturas mais altas ou mais baixas dependendo da espécie que se pretende isolar (Dhert, 1996). No entanto, muitas vezes opta-se por cultivar ambas as espécies misturadas, separando-as com um filtro na altura de as fornecer às larvas.

1.3.3 - O cultivo de rotíferos

A escolha de alimento vivo para alimentar os primeiros estádios larvares, em detrimento de dietas formuladas, está relacionada com o facto de as últimas tenderem a agregar, ao contrário do alimento vivo que está sempre disponível na coluna de água. Para além disso, as larvas de peixe são considerados predadores visuais, i.e. estão adaptadas para atacarem presas em movimento como acontece na natureza. Assim, a escolha de alimento vivo é importante para as larvas de peixe (Conceição *et al*, 2010).

Os rotíferos são cultivados em estruturas designadas por salas de cultivo auxiliar de produção de peixes. Estes pequenos organismos zooplânctónicos e eurihalinos apresentam movimentos lentos que permitem que larvas de peixe de

pequenas dimensões os possam capturar e podem ser cultivados em grandes densidades – cultivo intensivo – uma vez que a sua taxa de reprodução é elevada. Em condições favoráveis, estima-se que a população possa duplicar a cada um a cinco dias (Dhert, 1996), e os seus valores nutricionais podem ser manipulados pela administração de diferentes tipos de comida (Lubzens, 1987, Lubzens & Zmora, 2003). Estas características permitem que os rotíferos sejam uma das primeiras escolhas em alimento vivo para as larvas de peixes marinhos, em detrimento dos copepodes, apesar de, no seu habitat natural, estas larvas não se alimentarem preferencialmente de rotíferos, uma vez que têm à sua disposição uma grande variedade de alimento. O sucesso da produção das espécies alvo que se pretende produzir, está relacionada com a escolha da espécie de rotíferos a utilizar, com o tamanho e a definição dos parâmetros físicos (temperatura, salinidade) e do pH. Estes factores vão influenciar não só o desenvolvimento dos organismos, mas também a taxa de reprodução. As fêmeas, nutricionalmente superiores aos machos, ao reproduzirem-se por partenogénese – dando origem a fêmeas semelhantes – vão estimular a produção em massa (Lubzens & Zmora, 2003).

➤ **Qualidade da água:**

Salinidade

Sendo um organismo eurihialino, *Brachionus* sp. resiste a variações de salinidade muito elevadas, entre 1‰ a 97‰. No entanto, o valor ideal, aquele que assegura valores óptimos de reprodução, está abaixo dos 35‰ (Luzbens, 1987). Quando alimentados com produtos comerciais, estes organismos são mantidos numa salinidade de aproximadamente 20‰. Este valor permite que os produtos não se deterioreem tão rapidamente e que a probabilidade de contaminação por ciliados seja menor, uma vez que estes se desenvolvem melhor em salinidades mais elevadas.

Temperatura

Os rotíferos são organismos euritérmicos, i.e. resistem a diferentes temperaturas, à semelhança do que acontece com a salinidade. O valor óptimo ronda

os 25°C. No entanto diferentes temperaturas têm efeitos distintos nos organismos. O aumento da temperatura resulta num aumento da actividade reprodutiva, contudo resulta também numa deterioração dos produtos comerciais usados.

pH

Níveis de pH superiores a 6,6 são bem aceites pelos *Brachionus*, mesmo o pH do seu habitat natural sendo normalmente acima dos 7,5. Tanto o pH como a temperatura são importantes para o aumento da toxicidade da cultura. A razão $\text{NH}_3/\text{NH}_4^-$ é influenciada por estes factores, que, quando em grandes quantidades nos tanques de produção, podem fazer com que a cultura colapse (Dhert, 1996).

Oxigénio dissolvido

Os rotíferos sobrevivem em águas que contêm a partir de 2mg.L^{-1} oxigénio dissolvido. Este valor depende da temperatura, salinidade, tipo de alimento e densidade de animais no tanque. A temperaturas baixas ocorre uma maior dissolução do oxigénio. O arejamento não deve ser forte para evitar danos físicos na população (Dhert, 1996).

➤ **Produção intensiva**

Brachionus é um género que é facilmente mantido em culturas de diferentes dimensões, sejam culturas stock ou produções intensivas.

As culturas de inóculo (“stock”) são feitas em pequena escala e usadas normalmente para estudos de biologia e fisiologia ou para manter inóculos puros de *Brachionus*. Em estádios iniciais estes organismos são mantidos em tubos de ensaio e “Erlenmeyers” com água salgada a 20‰, iluminação contínua, temperaturas entre os 15 e os 18°C, e sem arejamento, para manterem o seu metabolismo de reprodução no mínimo. A inoculação de volumes maiores é feita a partir dos stocks iniciais como se observa na figura 6 (Pousão-Ferreira, 2009).

Para ser atingida a concentração ideal de rotíferos, necessária para produções intensivas, realizam-se culturas intermédias segundo dois métodos:

Método descontínuo

A produção neste sistema fechado é de curta duração. De dois em dois dias o volume é aumentado com a adição de microalgas, até que seja atingida a concentração pretendida. Altura em que é feita uma repicagem para volumes de cultivo iguais ou superiores (Pousão-Ferreira, 2009).

Método semi-contínuo

Para este método a técnica é semelhante à técnica do método anterior, no entanto quando a concentração de rotíferos desejada é atingida, retira-se $\frac{1}{4}$ do volume e acrescenta-se microalga. Este tipo de produção continua até que as condições do sistema estejam degradadas e seja necessário iniciar-se novo cultivo. Este método permite manter uma cultura durante bastante tempo, necessitando apenas de se iniciar novas culturas com os organismos já existentes no sistema (Pousão-Ferreira, 2009).

Após este processo os rotíferos passam por culturas de pré-produção, altura em que a concentração é suficiente para iniciar tanques de produção intensiva.

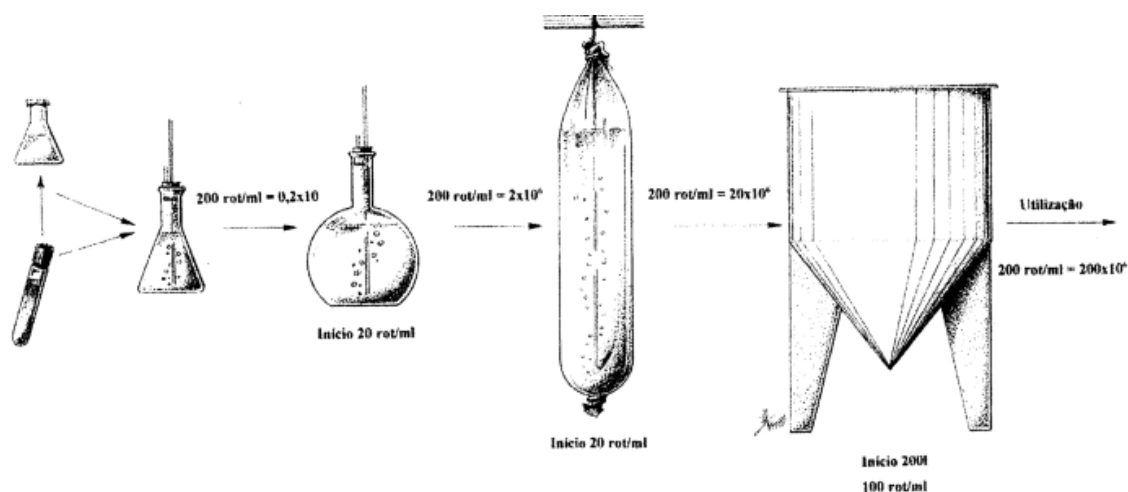


Figura 6 - Esquema de produção de rotíferos. (Desenho de J.J. Sá e Silva, fonte: *Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos*)

1.3.4 – Valor nutricional dos rotíferos

A importância dos rotíferos para o desenvolvimento larvar está na capacidade destes servirem como uma cápsula alimentar viva, que transmite as quantidades adequadas de nutrientes, vitaminas e por vezes antibióticos às larvas de peixes marinhos (Lubzens, 1987). O valor nutricional dos rotíferos para as larvas de peixes marinhos depende do seu peso seco, conteúdo calórico e composição bioquímica (Lubzens *et al.*, 1989)

Sendo o perfil lipídico dos rotíferos tão relevante para o desenvolvimento das larvas de peixe, a escolha de uma dieta adequada é muito importante. As larvas de peixes marinhos necessitam de elevados valores de EPA e DHA para o seu desenvolvimento (Ibeas *et al.*, 1997) e por isso a escolha da dieta tem que ter em atenção os constituintes que fornecem maiores valores destes ácidos gordos aos *Brachionus*. Os rotíferos são capazes de sintetizar PUFA, no entanto fazem-no a uma taxa insuficiente para satisfazer as necessidades das larvas de peixes marinhos (Lubzens *et al.*, 1989). Por esta razão é necessário fornecer aos rotíferos alimentos ricos nestas substâncias, para que estes incorporem elevadas quantidades destes ácidos gordos e os transmitam às larvas de peixes marinhos (Caric, 1993). A importância dos HUFA nos rotíferos para a nutrição das larvas de peixes marinhos tem sido muito abordada em procedimentos sobre o enriquecimento lipídico dos rotíferos (ver Lubzens & Zmora, 2003). Os lípidos nos rotíferos constituem 9 a 28% do seu peso seco. Cerca de 34 a 43% dos lípidos são fosfolípidos e 20 a 55% são trigliceróis, com pequenas quantidades de monogliceróis, digliceróis, esteróis e ácidos gordos livres (Fernandez-Reiriz *et al.*, 1993, Rainuzzo *et al.*, 1997). Quando cultivados apenas com levedura, os rotíferos são pobres em HUFAs que são necessários para uma boa taxa de sobrevivência e um desenvolvimento normal das larvas de peixes marinhos. Os conteúdos de DHA, EPA e ARA podem ser fornecidos aos rotíferos, como referido anteriormente, através de produtos de enriquecimento i) microalgas, ii) emulsões de óleos marinhos, iii) produtos comerciais (Hamre *et al.*, 2008), ou iv) alimentos micro-particulados (Walford & Lam, 1987). Por vezes os rotíferos são enriquecidos com outros componentes (vitaminas ou selenium) para realizar experiências em nutrição de

larvas de peixes marinhos, e ver a resposta destes, ao enriquecimento com diferentes componentes (Hamre *et al*, 2008).

2 - OBJECTIVOS

O presente trabalho, como já referido anteriormente, tem como intuito analisar diferentes dietas, e estudar as mais adequadas para atingir bons níveis de nutrição em alimento vivo, no caso concreto, das espécies *Brachionus plicatilis* e *Brachionus rotundiformis*, aqui denominadas por *Brachionus* sp., porque se utilizaram as duas em conjunto. Para atingir o objectivo principal foram utilizadas duas abordagens: a primeira virada para as taxas de crescimento e a bioencapsulação de lípidos e a segunda para as microalgas e as preferências dos rotíferos relativamente às algas cultivadas no IPIMAR. Tendo em conta estas foram definidos os seguintes objectivos:

- ⇒ Comparar taxas de crescimento entre rotíferos com diferentes produtos experimentais;
- ⇒ Analisar o perfil de ácidos gordos nas dietas e nos rotíferos, e estabelecer a dieta com o conteúdo lipídico mais adequado;
- ⇒ Comparar diferentes concentrações de uma mesma espécie de microalga, e determinar o comportamento dos rotíferos, através da análise das taxas de filtração;
- ⇒ Determinar a espécie de microalga com a qual os rotíferos obtêm taxas de filtração e de herbivoria mais elevadas;

3 - METODOLOGIA

3.1 - CULTIVO DE MICROALGAS E ROTÍFEROS

As microalgas usadas nos ensaios abaixo descritos foram produzidas segundo o *método batch* de produção em grande escala¹(Pousão-Ferreira, 2009). A produção de rotíferos em grande escala é realizada em duas fases, pré-produção e cultivo intensivo.

Pré produção

As culturas de pré-produção foram realizadas nos sacos de polietileno transparente onde previamente se iniciou uma cultura de microalgas. A inoculação destes sacos fez-se quando a alga estava quase a atingir a fase estacionária, i.e. a concentração máxima de microalgas. O aparecimento de espuma na cultura indicou que os rotíferos começaram a multiplicar-se. Quando a microalga começou a desaparecer (a cultura começou a ficar transparente) utilizou-se o volume da manga para inocular tanques de produção. Se os rotíferos não forem utilizados na altura certa, a população começa a envelhecer e o tanque inoculado não se desenvolve como pretendido. Esta fase tem extrema importância na produção, uma vez que inoculação de grandes volumes (500 a 3.000L) com pequenas concentrações, altera o meio de produção antes de ser atingida a concentração necessária, o que implica ter um maior número de tanques para conseguir produzir os rotíferos necessários (Pousão-Ferreira, 2009).

Cultivo intensivo

O cultivo intensivo foi feito em tanques que podem atingir capacidades de 3.000L. A inoculação destes foi feita, como referido anteriormente, a partir de um saco de polietileno com uma concentração elevada de rotíferos. Estes tanques de produção são normalmente mantidos com salinidade de 20‰, temperatura entre os 25°C e 28°C

¹ No cultivo *batch* pequenos volumes (250 mL por exemplo) inoculam volumes maiores (2L). Os últimos são usados para inocular grandes volumes (mangas/sacos de polietileno e tubos de PVC); e também para a manutenção das culturas de stock.

e constante iluminação, arejamento e oxigenação. Todos os tanques são esterilizados antes de utilização para garantir o mínimo de contaminação. Além da esterilização da água através de radiação UV e de filtros físicos e biológicos, a água quando adicionada ao tanque, é desinfetada com 1ml.L^{-1} de hipoclorito de sódio (lixívia comercial) concentrado e neutralizado, após 24 horas, com tiosulfato de sódio 150g.L^{-1} (1ml.L^{-1}). A produção intensiva de rotíferos foi alimentada com produtos comerciais que contêm levedura, produtos enriquecidos, microalgas liofilizadas, ou outros, dependendo do produto comercial.

Todos os métodos acima mencionados são processos rotineiros realizados pelos técnicos do IPIMAR. No entanto para os ensaios deste trabalho foi a autora que os realizou.

Em todos os ensaios, os rotíferos *Brachionus* spp., foram obtidos a partir de tanques de cultura (1000L) que estavam em constante produção. A cultura de rotíferos foi feita em tanques de capacidade total de 24L, em triplicado, com arejamento, oxigenação e temperaturas entre os 20°C e 24°C. A salinidade usada, foi de 20‰ e 37‰, dependendo do ensaio em curso, e a iluminação foi permanente.

3.2. - “SELENIUM” E “ÓLEOS DE ENRIQUECIMENTO”

Em todos os ensaios foi utilizado um volume de 15L de água salgada, com temperaturas de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e salinidade de 20‰. A salinidade usada neste ensaio apresentou um valor diferente do da água do mar, pois as leveduras deterioraram-se em salinidades elevadas. Cada tanque foi inoculado com 500rot.mL^{-1} designados por *Brachionus* sp.

3.2.1 – Pré-ensaios

Os testes feitos neste primeiro ensaio tinham como objectivo avaliar a viabilidade de um produto específico: *Ve-10*. Produzido pela empresa Necton SA, este é uma mistura das algas *Nannochloropsis oculata* *Chlorella vulgaris*, liofilizadas. Para

estimar a quantidade necessária de Ve-10 a fornecer aos rotíferos, foram realizados dois pré-ensaios (**A** e **B**). No ensaio **A** foram montados três tanques com dietas diferentes. O tanque de controlo foi alimentado com ω 3yeast60 (produto comercial à base de levedura da empresa Bernaqua™). Os outros dois foram alimentados com Ve-10 em diferentes concentrações ($0,3\text{g.L}^{-1}$ e $0,6\text{g.L}^{-1}$). O procedimento no ensaio **B** foi semelhante, a única diferença foram as concentrações Ve-10 usadas: $0,4\text{g.L}^{-1}$ e $0,6\text{g.L}^{-1}$. Nos dois ensaios cada dieta foi realizada em triplicado.

Nestes testes preliminares foram também testados dois sistemas de alimentação nocturna. O primeiro consistiu num alimentador automático composto por um conjunto de garrafas, com um tubo de ar e alimento, que estava anexo a cada tanque (figura 7). A uma hora previamente determinada (durante a noite) uma bomba de ar injectava ar na garrafa obrigando o alimento a sair. No segundo, o mesmo conjunto de garrafas estava ligado a uma bomba peristáltica (figura 8), que foi programada para alimentar os organismos durante a noite, a três horas diferentes (21h, 1h e 5h).



Figura 7 e 8 – Sistema de alimentação por injeção de ar em garrafas que continham alimento e sistema de alimentação com bomba peristáltica respectivamente. fotos da autora

3.2.2 Ensaios 1 e 2

Em ambos os ensaios foram usados 12 tanques com quatro dietas diferentes descritas na tabela 3. Cada tanque foi realizado em triplicado como esquematizado na figura 9.

As proporções de alimento foram constantes durante o período do ensaio e calculadas com base na contagem diária dos rotíferos, de acordo com a fórmula, onde A é a quantidade de alimento que vai ser administrada em cada refeição e n o número de rotíferos contados diariamente. $A = \frac{(0,4 \cdot n)}{6}$ (Pousão-Ferreira, comm. pess).

Tabela 3 – Composição dos diferentes tratamentos assim como a designação dos produtos e as quantidades utilizadas em % ou ml. Ensaio 1- **Dieta A₁** **A₂** - wyeast60, um produto comercial que inclui levedura e produtos de enriquecimento; **Dieta B₁** **B₂** – mistura de Ve-10 e fermento de padeiro (*Saccharomyces cerevisiae*); **Dieta C** e **D** são semelhantes entre si, além do Ve-10 e da levedura de padeiro ambas têm Se (levedura com selenium da Altech) em diferentes quantidades. Ensaio 2, os primeiros dois tratamentos são iguais aos referidos no ensaio 1; **Dieta E** e **F** têm Ve-10 e levedura de padeiro em diferentes quantidades. Óleo 1 - Qrill oil da Aker Aqua; Óleo 2 - óleo de peixe purificado Algatrium DHA70

	Designação	ω3yeast 60	VE-10	Levedura padeiro	Se	Óleo 1	Óleo 2
Ensaio 1	Dieta A₁	100	–	–		–	–
	Dieta B₁	–	70	30		–	–
	Dieta C	–	70	27,5	2,5	–	–
	Dieta D	–	70	29,75	0,25	–	–
Ensaio 2	Dieta A₂	100	–	–		–	–
	Dieta B₂	–	70	30		–	–
	Dieta E	–	57	25		18	–
	Dieta F	–	60	25		–	15

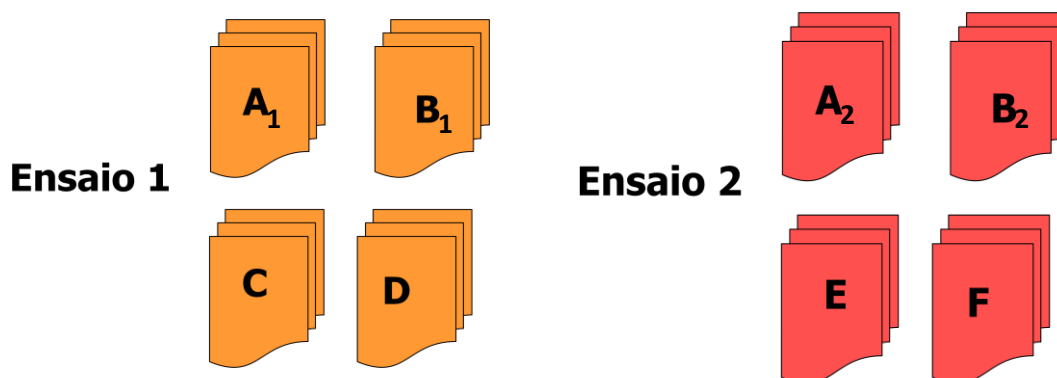


Figura 9 – Esquematização dos ensaios 1 e 2. Em cada ensaio foram aplicadas quatro dietas diferentes cada dieta foi realizada em triplicado. A, B, C, D, E e F explicados na tabela 3

A quantidade dos óleos também foi constante durante o ensaio, não estando dependente da contagem diária de rotíferos. Os óleos foram adicionados à dieta no 3º dia. A taxa de crescimento diária e específica dos rotíferos foi calculada segundo a fórmula em que r é a taxa de crescimento e Nt e $N0$ o número de rotíferos no tempo t e 0

$$r = \frac{\ln(Nt) - \ln(N0)}{t} \text{ (Omori \& Ikeda, 1984).}$$

3.3 - ANÁLISE DE ÁCIDOS GORDOS

Para este processo foi aplicado um protocolo específico, segundo a metodologia usada no IPIMAR. De acordo com esta, amostras de rotíferos concentradas foram recolhidas para *ependorfs* e mantidas em nitrogénio líquido durante o mínimo de 24 horas, para serem crio-preservadas. Após este processo as amostras foram liofilizadas, durante 24 horas, pesadas e adicionada uma solução de cloreto de acetilo e metanol; a solução resultante foi agitada e colocada num banho de 80°C durante uma hora. Depois deste período acrescentou-se água Mili-Q e N-heptano, a amostra foi centrifugada e a fase orgânica recolhida. O processo de extracção e quantificação dos ácidos gordos das amostras foi efectuado segundo o método de transesterificação por catálise ácida (Park and Kazlauskas, 2001). Para a

análise qualitativa e quantitativa da composição em ácidos gordos das amostras foi usada a técnica de cromatografia em fase gasosa. Os ésteres metílicos derivatizados dos ácidos gordos (FAME) foram analisados no cromatógrafo em fase gasosa, Varian CP 3800 com detector de chama de ionização (FID). Os FAME foram separados numa coluna DB-WAX Polyethylene glycol” (30m x 0,25mm ID, 0,25µm). A temperatura do injector e do detector foram mantidas constantes a 250°C durante 40min. A coluna foi sujeita a uma rampa de temperatura iniciando-se nos 180°C durante 5min e acabando nos 220°C durante 25min. O padrão interno utilizado foi o ácido gordo saturado 21:0 na concentração de 10mg.mL⁻¹. Os resultados foram obtidos sob a forma de um cromatograma. A identificação dos picos foi efectuada pelo método directo, através dos tempos de retenção de FAME, utilizando como padrão um óleo comercial PUFA n°3 extraído do menhadem-escamudo (*Brevoortia patronus*) (SIGMA-ALDRICH™, USA).

3.4 - TAXAS DE FILTRAÇÃO E HERBIVORIA

No ensaio realizado para calcular as taxas de filtração e herbivoria optou-se por usar um volume de 10L em cada tanque, temperaturas de 22°C±2°C e salinidade de 37‰, que é a salinidade normal do cultivo de microalgas marinhas. Cada tanque foi inoculado com *Brachionus* sp. 500rot.mL⁻¹. Para cada teste foram montados um total de 18 tanques como esquematizado na figura 10, e foram testadas três espécies de algas em três diferentes concentrações conforme explicado na tabela 4. À parte foram mantidos o mesmo número de tanques com a mesma concentração de microalga mas sem rotíferos (tanques de controlo).

Tabela 4- Concentração das diferentes algas testadas. Cada ensaio testou uma microalga em diferentes concentrações. Os tanques do grupo de controlo tinham as mesmas concentrações de microalgas mas não tinham rotíferos.

Concentração microalgas (10 ⁶ cel/mL)	Baixa (B)	Média (M)	Elevada (E)
Nannochloropsis oculata (No)	5	10	20
Isochrysis galbana (Iso)	0,5	1	2
Tetraselmis suecica (Tet)	0,2	0,4	0,6

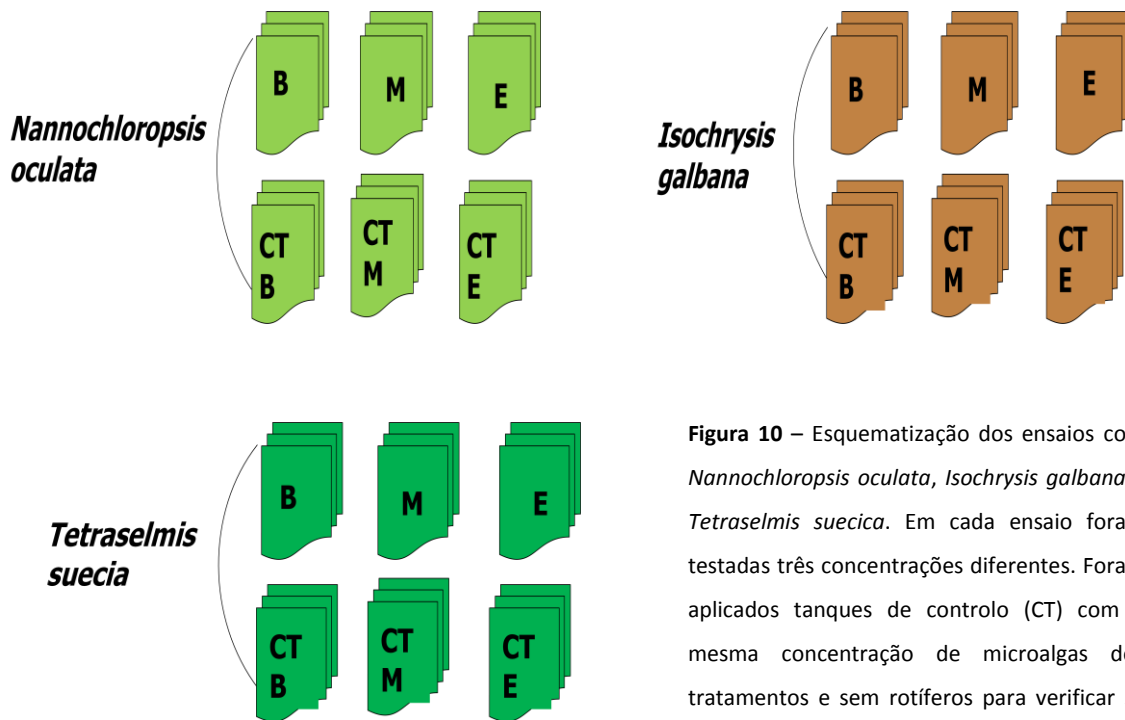


Figura 10 – Esquematização dos ensaios com *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica*. Em cada ensaio foram testadas três concentrações diferentes. Foram aplicados tanques de controlo (CT) com a mesma concentração de microalgas dos tratamentos e sem rotíferos para verificar se havia crescimento das microalgas. Todos os tanques foram feitos em triplicado.

Brachionus sp. foi submetido a um período de 12 horas sem alimento, antes do começo da experiência, para garantir que não haveria qualquer influência, nos resultados, da alimentação que estava a ser dada a estes rotíferos antes do início do ensaio. Um volume de alga (que dependia da sua concentração) foi depositado nos tanques contendo os rotíferos. Foram retiradas amostras em cada hora, durante 4 horas, e conservadas em pequenos frascos com Lugol, para contagem posterior. As taxas de filtração e herbívoros foram calculadas pelas fórmulas (Frost, 1972)

$$F = \frac{V}{n} \times \frac{\ln Ct - \ln Ctf}{t} \quad G = \frac{V}{n} \times \frac{\ln Ct - \ln Ctf}{t} \times \frac{Ctf - C0}{\ln Ctf - \ln C0}$$

F e **G** são as taxas de filtração e herbívoros, respectivamente, *V* é o volume do tanque e *n* o número de rotíferos. *Ct* e *Ctf* são as concentrações das microalgas no tempo *t* para o tanque do tratamento e o respectivo controlo.

3.5 – CONTAGEM

A densidade das microalgas foi contada num microscópio óptico (Zeiss – Axiostar plus) usando uma câmara de Burkner. A densidade de rotíferos foi estimada a partir de uma amostra de 1mL usando uma lupa (Zeiss – Stemi 2000 C). Todas as contagens foram realizadas em triplicado. Quando as amostras conservadas em Lugol foram contadas, apenas foram tidos em conta os rotíferos que apareceram com coloração; todos os outros foram considerados mortos antes da adição da solução.

3.6 - TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A análise descritiva, efectuada nos dados permitiu calcular a taxa de crescimento dos rotíferos durante o período da experiência, e as taxas de filtração e herbivoria segundo as fórmulas em cima referenciadas. Os gráficos foram realizados usando o Excel 2007.

A análise estatística foi usada na comparação das dietas nos ensaios 1 e 2 e nas taxas de filtração e herbivoria, para observar a existência de diferenças significativas, através da utilização de uma análise de variância (ANOVA). O conteúdo de ácidos gordos, em cada tratamento, foi observado através de uma ANOVA, para verificar a existência de diferenças significativas entre rotíferos alimentados com diferentes dietas. Foram realizados testes *a posteriori* (Holm-Sidak), sempre que na ANOVA a hipótese nula foi rejeitada e se detectaram diferenças significativas entre as médias testadas. No ensaio “Filtração e Herbivoria” foram também realizadas regressões lineares para estabelecer a existência de relação entre o número de rotíferos e de células de microalgas e o crescimento destas. Toda a análise estatística foi realizada para $p < 0,05$ no software SigmaPlot®.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELENIUM E ÓLEOS DE ENRIQUECIMENTO

4.1.1 Pré ensaios

O pré-ensaio realizado para definir a concentração de alimento a dar aos rotíferos mostrou que a concentração de Ve-10 $0,4\text{g.L}^{-1}$ era suficiente para um aumento constante do número de rotíferos e não deixava tantos resíduos como em concentrações mais elevadas. Em todos os ensaios com Ve-10 aquela foi a concentração usada. O sistema de alimentação nocturno adoptado foi a bomba peristáltica. Esta permitiu a distribuição do alimento por diferentes períodos durante a noite, sendo por isso um sistema mais rigoroso que o de injeção de ar nas garrafas que dava o alimento aos rotíferos de uma só vez a uma hora determinada.

4.1.2 Ensaios 1 e 2

Os ensaios 1 e 2 compararam 4 dietas diferentes durante um período de cinco dias, e a taxa de crescimento específico foi calculada para este período de tempo. No ensaio 1 a tabela 5 mostra que o crescimento específico dos tratamentos A e B; C e D atingiu valores semelhantes. Todos os tratamentos tiveram um crescimento positivo, o que significa que a concentração de rotíferos final aumentou relativamente à concentração inicial de 500 rot.mL^{-1} . Nos dois primeiros tratamentos a concentração final esteve entre os $645\text{-}665 \text{ rot.mL}^{-1}$, em C e D esta atingiu os $735\text{-}756 \text{ rot.mL}^{-1}$. No ensaio 2 os valores também não variaram entre si. Os tratamentos A e B tiveram uma concentração final de 640 rot.mL^{-1} e 602 rot.mL^{-1} , respectivamente. Por seu lado E e F alcançaram valores entre os 668 e 690 rot.mL^{-1} . Ao contrário do que se verificou com Penglase *et al.* (2010), os valores de crescimento específico no ensaio 1 apresentaram uma preferência dos rotíferos pelos tratamentos com selenio. Este componente tem grande importância na dieta dos rotíferos, dado que eles têm uma grande deficiência deste mineral e as dietas comerciais, geralmente utilizadas, têm valores de selenio muito baixos (Hamre *et al.*, 2008).

Tabela 5 – Taxa de crescimento específico dos rotíferos num período de 5 dias. O ensaio 1 e 2 têm dois tratamentos iguais A e B e dois diferentes C e D e E e F. **a** e **b** representam diferentes quantidades de selenium, 2.5% e 0.25% respectivamente. **1** e **2** são os diferentes óleos, Qrill e Algatrium respectivamente

Dieta	Taxa de crescimento específico
Ensaio 1	
T_A - ω3yeast60	0,05 \pm 0,010
T_B - Ve-10 + levedura de padeiro	0,05 \pm 0,026
T_C - Ve-10 + levedura de padeiro + Se^a	0,08 \pm 0,013
T_D - Ve-10 + levedura de padeiro + Se^b	0,08 \pm 0,019
Ensaio 2	
T_A - ω3yeast60	0,05 \pm 0,015
T_B - Ve-10 + levedura de padeiro	0,04 \pm 0,034
T_E - Ve-10 + levedura de padeiro + óleo	0,06 \pm 0,039
1	
T_F - Ve-10 + levedura de padeiro + óleo 2	0,06 \pm 0,004

Como se observa na figura 11, existem algumas diferenças entre a evolução dos tratamentos com e sem selenium. Todavia estas não são estatisticamente significativas. Apesar de os valores obtidos nos tratamentos A e D serem diferentes, foi possível observar, em ambos, um comportamento semelhante. A observação da figura 11, mostra também que a dieta C com 2,5% de selenium na sua constituição, e uma taxa de crescimento específica elevada, apresentou uma quebra no 2º dia, o que, possivelmente, indica que o selenium foi limitativo no crescimento destes rotíferos. Como referido, a análise estatística às diferentes dietas mostrou que nestas, embora se tenham observado diferenças nas taxas de crescimento nos gráficos, estatisticamente as dietas não influenciaram este crescimento ($F=2.36$, $p=0.121$).

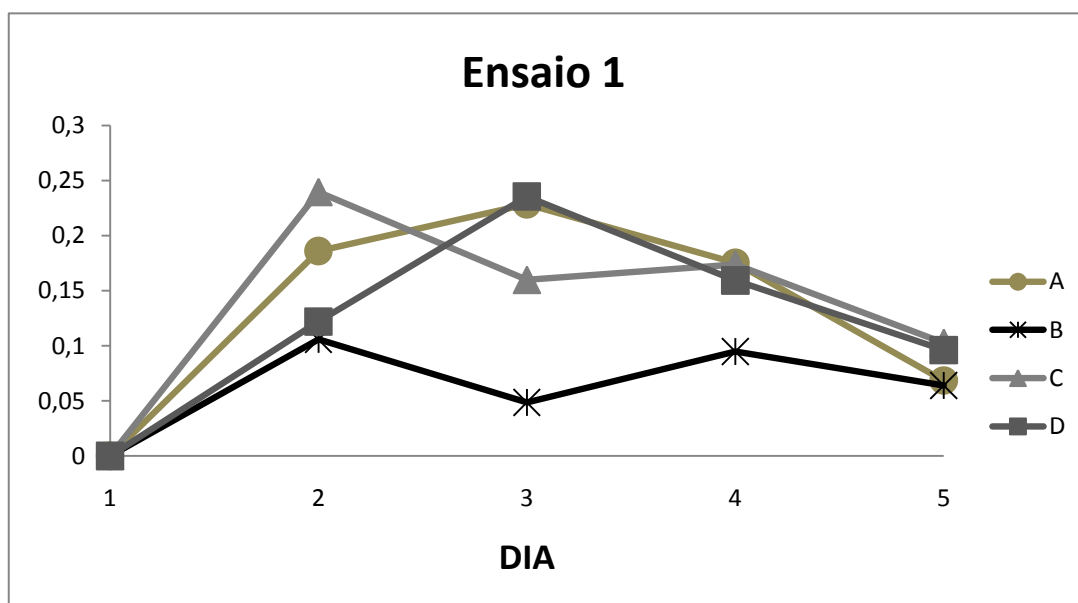


Figura 11 – Taxa de crescimento dos rotíferos durante 5 dias. 4 tratamentos foram testados. **A** – ω 3yeas60; **B** – Ve-10+ fermento de padeiro; **C** – Ve-10 + fermento de padeiro + selenium (2,5%); **D** – Ve-10+ fermento de padeiro+ selenium (0,25%)

Como referido anteriormente, a concentração final de rotíferos no ensaio 2 em A, B, E e F é respectivamente 640, 602, 668 e 690 rot.mL⁻¹. Em termos gerais estes valores encontram-se muito próximos uns dos outros o que poderia significar que não existe diferença entre as dietas, porém, é de referir que entre a dieta B e F, cuja diferença é apenas o óleo, existem quase mais 100 rot/mL, o que em número de rotíferos significa 1,5 milhões (para um volume de 15L). Segundo Kostopoulou et al. (2006) a composição da dieta destes organismos afecta a estrutura da sua população, culminando em diferenças significativas na taxa de crescimento. As diferenças observadas entre as dietas B, E e F devem-se, possivelmente, aos óleos de enriquecimento (1 e 2) que foram administrados nas dietas, mas, estatisticamente, a comparação de dietas não revelou valores significativos.

Na figura 12 observa-se que os valores da taxa de crescimento dos rotíferos alimentados com a dieta F têm um pico no 2º dia e uma descida abrupta no dia seguinte, para valores de taxa de crescimento inferiores a 0,05. Nos dias seguintes esta taxa atinge valores superiores a 0,05. A adição dos óleos no 3º dia poderá ter provocado a descida no tratamento F, uma vez que nos dias seguintes a taxa de crescimento voltou a subir, possivelmente os rotíferos precisaram de um tempo para se habituarem ao óleo. A análise de variância, comparando os diferentes tratamentos neste ensaio, apresentou valores não significativos, como já tinha sido referido ($F=0.874$, $p=0.481$), indicando que apesar das diferenças nos números de rotíferos, estatisticamente os tratamentos não influenciaram o crescimento destes.

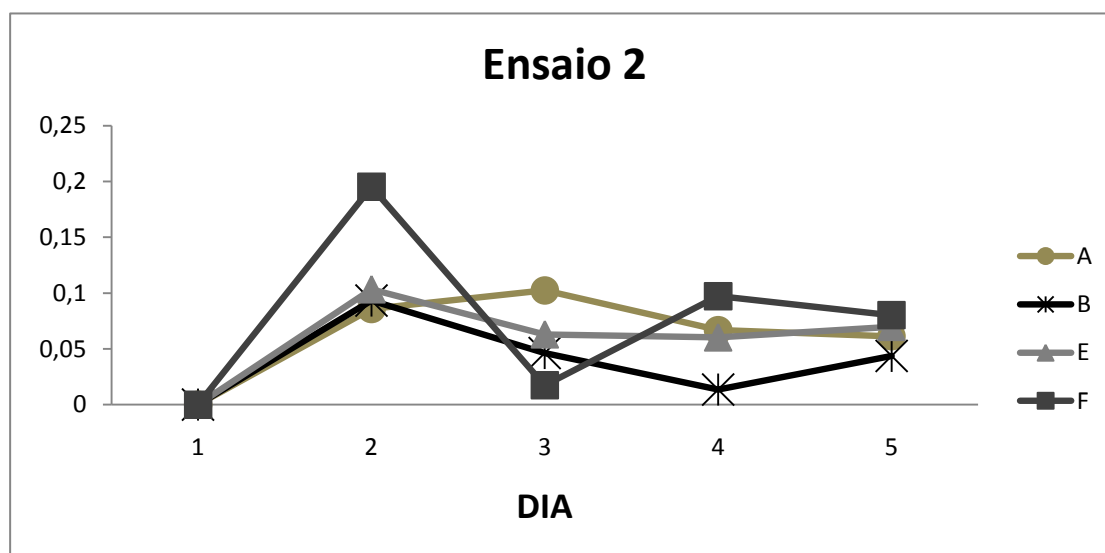


Figura 12 – Taxa de crescimento dos rotíferos durante 5 dias. 4 tratamentos foram testados. **A** – ω 3yeast60; **B** – Ve-10+ fermento de padeiro; **E** – Ve-10 + fermento de padeiro + óleo 1; **F** – Ve-10+ fermento de padeiro+ óleo 2

4.1.3 - Ácidos gordos

Tabela 6 – Total de FAME (mg g⁻¹ de amostra) e perfil em ácidos gordos (% ácidos gordos totais DW) dos constituintes das dietas experimentais usadas na alimentação de *Brachionus* sp.)

Tratamentos	ω 3yeast60	Ve-10	Levedura Padeiro	Selenium	Krill	Algatrium
Total FAME (mg g ⁻¹)	260,6	108,9	99,6	99,9	753,4	570,1
Ácidos gordos						
14:00	5,9	3,2	0,4	0,4	15,3	0,1
16:00	27,8	20,3	17,1	10,9	24,0	0,7
18:00	3,9	0,2	13,5	5,2	1,2	0,1
Total - SFA	38,3	27,2	32,1	16,5	42,8	1,1
16:1*	13,4	14,9	30,5	36,8	9,9	0,5
18:1*	13,5	3,5	34,4	34,1	17,5	1,0
20:1*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,8
Total - MUFA	26,9	19,2	64,9	71,0	28,9	4,3
18:2n6	0,3	21,1	1,1	1,2	1,9	0,2
18:3n3	0,1	1,6	0,2	0,0	0,8	0,1
20:4n6 - ARA	1,0	1,2	0,0	0,0	0,4	1,0
20:4n3	0,5	0,0	0,0	0,0	0,4	0,7
20:5n3 - EPA	0,7	9,5	0,0	0,9	13,5	7,0
22:5n3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,3	6,5
22:6n3 - DHA	22,2	0,0	0,0	10,0	5,4	72,8
Total - PUFA	33,8	34,2	2,5	12,4	28,1	86,2
Sn3	23,8	11,4	0,2	10,9	23,8	88,4
Sn6	10,0	22,4	1,1	1,2	2,1	6,0
Sn3/Sn6	2,4	0,5	0,2	8,8	9,9	14,8
n-3 HUFA	23,0	9,5	0,0	10,9	19,1	86,2
DHA/EPA	33,7	0,0	0,0	11,7	0,4	10,5
EPA/ARA	0,7	7,7	0,0	0,0	33,0	7,2
ARA/EPA	1,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1

Valores representam a média dos ácidos gordos presentes nos lípidos totais das dietas; **g** - soma dos isómeros 16:1n-7 e 16:1n-9; **h** – soma dos isómeros 18:1n-9, 18:1n-7 e 18:1n-5; **i** – soma dos isómeros 20:1n-11, 20:1n-9 e 20:1n-7. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$); FAME, éster metílico de ácido gordo; AGT, ácidos gordos totais; SFA, ácidos gordos saturados; MUFA, ácidos gordos monoinsaturados; PUFA, ácidos gordos polinsaturados; HUFA, ácidos gordos altamente insaturados

Tabela 7 – Valor dos ácidos gordos (% ácidos gordos totais DW) 20:5n3 e 22:6n3 nas dietas, calculado matematicamente a partir do valor dos ácidos gordos de cada constituinte (apresentado na tabela 6), segundo as proporções utilizadas e referidas na tabela 3

ÁCIDOS GORDOS	EPA 20:5n3	DHA 22:6n3
Dieta A₁	0,7	22,20
Dieta B₁	6,65	0,00
Dieta C	6,88	0,25
Dieta D	6,65	0,03
Dieta A₂	0,70	22,20
Dieta B₂	6,65	0,00
Dieta E	7,85	0,97
Dieta F	6,75	10,92

Tabela 8 – Total de FAME (mg g⁻¹ de amostra) e perfil em ácidos gordos (% AGT) nos lípidos totais dos rotíferos alimentados com as dietas do ensaio 1.

Tratamentos	Dieta A ₁			Dieta B ₁			Dieta C			Dieta D		
Total FAME (mg g ⁻¹)	75,8			107,7			62,8			50,2		
Ácidos gordos												
14:0	4,3 ^a	±	0,5	3,3 ^b	±	0,1	2,8 ^b	±	0,4	2,6 ^b	±	0,2
16:0	19,0 ^a	±	2,3	15,9 ^{ab}	±	0,5	14,0 ^b	±	1,2	13,4 ^b	±	0,7
18:0	4,8	±	0,4	4,4	±	0,4	4,4	±	0,1	5,6	±	1,9
Total - SFA	32,4 ^a	±	3,5	28,7 ^{ab}	±	0,4	25,9 ^b	±	1,7	26,7 ^b	±	1,0
16:1	8,0 ^a	±	0,8	13,7 ^b	±	0,5	12,6 ^b	±	1,3	12,3 ^b	±	1,2
18:1	17,5	±	1,3	18,4	±	1,2	18,0	±	1,0	17,2	±	2,1
20:1	2,9	±	0,2	2,6	±	0,1	3,1	±	0,4	3,3	±	0,4
Total - MUFA	28,6 ^a	±	1,8	35,3 ^b	±	1,2	34,5 ^b	±	0,8	33,8 ^b	±	2,6
18:2n6	0,4 ^a	±	0,1	14,7 ^b	±	1,3	15,7 ^b	±	0,7	15,1 ^b	±	1,0
18:3n3	0,1 ^a	±	0,2	1,1 ^b	±	0,2	1,1 ^b	±	0,0	1,1 ^b	±	0,1
20:4n6 - ARA	3,9 ^a	±	0,1	2,0 ^b	±	0,0	2,3 ^b	±	0,3	2,4 ^b	±	0,1
20:4n3	1,2 ^a	±	0,1	0,5 ^b	±	0,0	0,6 ^b	±	0,1	0,7 ^b	±	0,1
20:5n3 - EPA	3,8	±	0,0	4,4	±	0,6	5,2	±	0,6	5,7	±	0,4
22:5n3	2,0	±	0,4	0,6	±	0,5	0,6	±	0,7	0,9	±	0,7
22:6n3 - DHA	17,6 ^a	±	3,3	1,5 ^b	±	0,4	1,5 ^b	±	0,4	1,9 ^b	±	0,2
Total - PUFA	37,7 ^a	±	5,2	28,9 ^b	±	0,4	31,9 ^{ab}	±	0,7	32,7 ^{ab}	±	2,2
Sn3	25,7 ^a	±	3,6	9,7 ^b	±	0,9	10,9 ^b	±	0,4	11,9 ^b	±	0,9
Sn6	11,9 ^a	±	1,6	18,7 ^b	±	1,3	20,4 ^b	±	0,5	20,3 ^b	±	1,5
Sn3/Sn6	2,2 ^a	±	0,0	0,5 ^b	±	0,1	0,5 ^b	±	0,0	0,6 ^b	±	0,0
n-3 HUFA	23,4 ^a	±	3,7	6,5 ^b	±	0,9	7,4 ^b	±	0,5	8,5 ^b	±	0,6
DHA/EPA	4,6 ^a	±	0,9	0,4 ^b	±	0,1	0,3 ^b	±	0,1	0,3 ^b	±	0,0
EPA/ARA	1,0 ^a	±	0,0	2,2 ^b	±	0,3	2,3 ^b	±	0,2	2,4 ^b	±	0,2
ARA/EPA	1,0 ^a	±	0,0	0,5 ^b	±	0,1	0,4 ^b	±	0,0	0,4 ^b	±	0,0

Valores representam a média ± desvio padrão dos ácidos gordos presentes nos rotíferos alimentados com as diferentes dietas. **g** - soma dos isómeros 16:1n-7 e 16:1n-9; **h** – soma dos isómeros 18:1n-9, 18:1n-7 e 18:1n-5; **i** – soma dos isómeros 20:1n-11, 20:1n-9 e 20:1n-7. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$); FAME, éster metílico de ácido gordo; AGT, ácidos gordos totais; SFA, ácidos gordos saturados; MUFA, ácidos gordos monoinsaturados; PUFA, ácidos gordos polinsaturados; HUFA, ácidos gordos

Tabela 9 – Total de FAME (mg g⁻¹ de amostra) e perfil em ácidos gordos (% AGT) nos lípidos totais dos rotíferos alimentados com as dietas do ensaio 2

Tratamentos	Dieta A ₂			Dieta B ₂			Dieta E			Dieta F		
Total FAME (mg g ⁻¹)	44,2			51,2			127			68,3		
Ácidos gordos												
14:0	4,8 ^a	±	0,9	3,0 ^{ac}	±	0,2	7,8 ^b	±	1,3	2,2 ^c	±	0,7
16:0	19,6	±	3,7	14,2	±	1,2	18,4	±	2,1	15,1	±	3,6
18:0	3,6 ^{ab}	±	0,6	4,3 ^a	±	0,4	2,8 ^b	±	0,1	3,6 ^{ab}	±	0,7
Total - SFA	33,0	±	5,1	26,8	±	1,0	33,1	±	2,8	24,6	±	5,8
16:1	7,6 ^a	±	1,0	12,7 ^b	±	1,1	11,6 ^b	±	0,9	9,3 ^{ab}	±	2,1
18:1	14,9 ^a	±	2,7	18,0 ^{ab}	±	2,0	21,2 ^b	±	1,3	13,4 ^a	±	1,1
20:1	2,4	±	0,5	3,4	±	0,7	2,9	±	0,6	2,4	±	0,5
Total - MUFA	25,5 ^a	±	3,3	34,9 ^b	±	1,6	36,4 ^b	±	1,0	26,1 ^a	±	2,7
18:2n6	0,5 ^a	±	0,2	14,2 ^b	±	1,1	7,6 ^c	±	0,2	9,6 ^d	±	0,9
18:3n3	0,3 ^a	±	0,1	1,0 ^b	±	0,1	0,8 ^c	±	0,0	0,6 ^d	±	0,1
20:4n6 - ARA	3,6 ^a	±	0,4	2,3 ^c	±	0,3	0,9 ^b	±	0,1	1,9 ^c	±	0,3
20:4n3	1,1 ^a	±	0,0	0,6 ^b	±	0,1	1,0 ^a	±	0,2	0,6 ^b	±	0,1
20:5n3 - EPA	3,5 ^a	±	0,4	4,9 ^{ab}	±	0,7	7,0 ^b	±	0,9	6,6 ^b	±	1,4
22:5n3	2,0 ^{ab}	±	0,7	0,0 ^a	±	0,0	1,0 ^a	±	0,1	4,0 ^b	±	1,6
22:6n3 - DHA	18,6 ^a	±	4,8	2,5 ^b	±	0,4	3,6 ^b	±	0,9	17,3 ^a	±	7,1
Total - PUFA	38,6	±	7,6	31,8	±	4,4	25,7	±	2,7	44,2	±	9,9
Sn3	26,4 ^{ab}	±	5,5	12,2 ^a	±	3,8	14,4 ^{ab}	±	2,2	30,2 ^b	±	10,2
Sn6	12,0 ^{bc}	±	2,2	19,0 ^a	±	1,2	9,1 ^b	±	0,6	13,8 ^c	±	0,4
Sn3/Sn6	2,2 ^a	±	0,1	0,6 ^b	±	0,2	1,6 ^{ab}	±	0,2	2,2 ^a	±	0,8
n-3 HUFA	24,1 ^{ac}	±	5,6	7,4 ^b	±	1,0	11,6 ^{ab}	±	1,8	27,8 ^c	±	10,1
DHA/EPA	5,3 ^a	±	1,5	0,5 ^b	±	0,1	0,5 ^b	±	0,1	2,6 ^c	±	0,5
EPA/ARA	1,0 ^a	±	0,0	2,1 ^b	±	0,2	7,9 ^c	±	0,3	3,4 ^d	±	0,2
ARA/EPA	1,0 ^a	±	0,0	0,5 ^b	±	0,0	0,1 ^c	±	0,0	0,3 ^d	±	0,0

Valores representam a média ± desvio padrão dos ácidos gordos presentes nos rotíferos alimentados com as diferentes dietas. **g** - soma dos isómeros 16:1n-7 e 16:1n-9; **h** – soma dos isómeros 18:1n-9, 18:1n-7 e 18:1n-5; **i** – soma dos isómeros 20:1n-11, 20:1n-9 e 20:1n-7. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$); FAME, éster metílico de ácido gordo; AGT, ácidos gordos totais; SFA, ácidos gordos saturados; MUFA, ácidos gordos monoinsaturados; PUFA, ácidos gordos polinsaturados; HUFA, ácidos gordos

No ensaio 1, os rotíferos sujeitos à dieta A₁ foram os que apresentaram níveis de incorporação mais elevados de DHA; por sua vez os rotíferos sujeitos às dietas C e D apresentaram os maiores valores de EPA, como se observa na tabela 8. Estes resultados estão de acordo com a tabela 7 - que apresenta o valor das diferentes dietas para os ácidos gordos EPA e DHA e, tal como esperado, os rotíferos incorporam mais DHA na dieta A₁ e mais EPA em qualquer uma das dietas B₁, C, ou D, pois estas apresentam valores semelhantes. Tanto o EPA como o DHA são ácidos gordos que contribuem para funções metabólicas nas larvas de peixes marinhos (Ibeas *et al*, 1997). Os ácidos gordos presentes nos tecidos dos peixes, são também ricos em DHA, EPA e ARA; porém, os tecidos neurais dos peixes que inclui o cérebro e os olhos, são particularmente ricos em DHA (Sargent, 1997). Para que as larvas de peixes marinhos possam obter estes ácidos gordos, é importante que a dieta do alimento vivo permita a incorporação dos mesmos.

A razão DHA/EPA para os rotíferos alimentados com as dietas B₁, C e D foi inferior ao desejado, porque se procura fornecer dietas com valores iguais ou superiores a 2 (Bell *et al*, 2003). Os peixes, e em particular os seus ovos são naturalmente ricos em DHA e EPA numa razão igual ou superior a 2 (Tocher & Sargent, 1984). Os peixes necessitam destes ácidos gordos, devido à sua incapacidade de os sintetizar em quantidades que satisfaçam os seus requisitos nutricionais (Teshima *et al*, 1987). No entanto, nos estádio iniciais, as larvas de peixes marinhos precisam ainda de maiores quantidades de DHA por terem taxas de crescimento muito rápidas, e para que o seu desenvolvimento, principalmente a nível cerebral e ocular, se faça correctamente. Para os rotíferos alimentados com a Dieta A₁, a razão DHA/EPA foi superior a 4.

No ensaio 2, os rotíferos alimentados com a dieta A₂ e F manifestaram níveis de incorporação de DHA mais elevados, como seria de esperar e se pode observar pela nas tabelas 7 e 9. Por sua vez os valores de EPA foram mais elevados nos rotíferos alimentados com as dietas E e F, como esperado, pela observação da tabela 9. Deste modo, pode-se considerar que a dieta F é mais completa uma vez que apresenta valores elevados de DHA (embora não tão elevados como os valores dos rotíferos sujeitos à dieta A₂) e de EPA. A relação DHA/EPA foi mais elevada em A₂ e F, o que

significa que estas dietas são mais adequadas para os rotíferos e consequentemente para as larvas de peixes marinhos.

Em ambos os ensaios a dieta que permitiu aos rotíferos incorporar mais ARA foi a dieta A. A importância de ARA no crescimento e desenvolvimento de juvenis de peixes já foi demonstrada (Bell *et al*, 1995). ARA é o maior precursor dos eicosanóides das células dos peixes, e está envolvido na regulação de inúmeros processos fisiológicos (Cejas *et al*, 2003). Têm sido feitos estudos relacionando a presença de ARA, em grandes ou pequenas quantidades, com a pigmentação dos peixes planos (Bell *et al.*, 2003). Para este ácido gordo poder estar presente nas larvas de peixe, e posteriormente nos peixes adultos, é essencial que esteja na dieta dada ao alimento vivo (Sargent, *et al*, 1997), apesar de não ser necessário em tão grande quantidade, como EPA e DHA.

A análise estatística realizada aos rotíferos alimentados com as diferentes dietas do ensaio 1 revelou diferenças significativas em alguns ácidos gordos. O valor de DHA para os rotíferos alimentados com a dieta A₁ é significativamente diferente de todas as outras dietas. Os níveis de incorporação de ácidos gordos com esta dieta são mais elevados, e esta diferença é estatisticamente significativa. Relativamente à incorporação de EPA por parte dos rotíferos, as dietas B₁, C e D apresentaram valores de incorporação mais elevados, contudo, a análise estatística que comparou estas diferentes dietas, mostrou que não existem diferenças significativas entre elas, isto é, que a diferença de valores não significa que alguma das dietas seja melhor para a incorporação de EPA pelos rotíferos. A incorporação de ARA pelos *Brachionus* teve maiores valores com a dieta A₁, e, estatisticamente, esta diferença também se observou, sendo a dieta A₁ a mais adequada para a incorporação deste ácido gordo.

No ensaio 2 os maiores valores de incorporação de DHA foram obtidos pelos rotíferos alimentados com as dietas A₂ e F, estatisticamente observou-se que estas duas dietas diferem das restantes, mas que no entanto, não diferem entre si. As duas dietas são favoráveis à incorporação de DHA. A análise estatística dos valores de EPA incorporados pelos *Brachionus* foi significativa para os que foram sujeitos às dietas E e F, e A₂. Estas três dietas apresentaram diferenças significativas entre si, no entanto

apresentaram também semelhanças com a dieta B₂. Apesar de os rotíferos sujeitos às dietas E e F terem obtidos valores elevados de incorporação para o EPA, não foi possível afirmar, estatisticamente, qual das duas seria a melhor dieta. Os valores de incorporação de ARA são significativamente diferentes entre A₂, B₂ e E e F. Novamente E e F não apresentam diferenças significativas entre elas. A dieta A₂ pode ser considerada a melhor para a incorporação de ARA uma vez que obteve os valores mais elevados, e que estatisticamente estes são diferentes das outras dietas.

A análise das diferentes dietas segundo os parâmetros: crescimento e valor nutricional de *Brachionus*, permitiu aferir que, apesar das diferenças observadas nos gráficos e tabelas, não houve diferenças estatísticas entre as dietas, isto o que significa que para fazer crescer rotíferos (cultivo em grande escala) qualquer dieta cumpre esse propósito, podendo demorar mais ou menos dias para atingir grandes quantidades de rotíferos. Em termos nutricionais as Dietas A₁, A₂ e F foram responsáveis por elevados níveis de incorporação de diferentes ácidos gordos. No ensaio 1 a dieta A₁ seria a adequada para obter os níveis de HUFAS necessários às larvas de peixes marinhos; no ensaio 2 a dieta A₂ obteve bons níveis de incorporação, no entanto a dieta F mostrou ser mais adequada e completa para a produção nutricional de rotíferos.

4.2 – FILTRAÇÃO E HERBIVORIA

A taxa de crescimento dos rotíferos utilizados nos ensaios de filtração e herbivoria, apresentou diferentes comportamentos consoante as diferentes concentrações das dietas como se observa nas figuras 13, 14 e 15. Nas três figuras é possível observar que a taxa de crescimento para *Nannochloropsis oculata* é sempre negativa nas primeiras horas. Durante este tempo, apenas foi possível aferir a mortalidade de rotíferos e não o crescimento; é provável que os rotíferos tenham decrescido no início por haver um período de adaptação destes à alga. Nas diferentes concentrações de *Isochrysis galbana* o comportamento da taxa de crescimento é semelhante mas não constante. Por sua vez *Tetraselmis suecica* tem uma taxa de crescimento constante em todas as concentrações de microalga. Estatisticamente, nenhuma das dietas apresenta diferenças significativas, entre as diferentes concentrações (No $p=0,454$; Iso $p=0,656$ e Tet $p=0,175$).

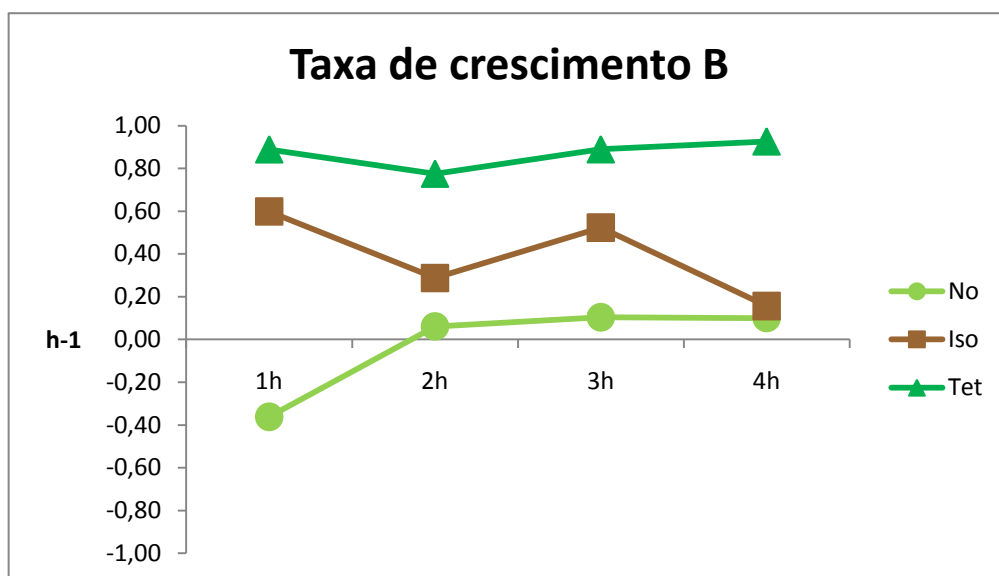


Figura 13 – Taxa de crescimento dos rotíferos para concentrações Baixas, nas diferentes microalgas
No – *Nannochloropsis oculata*; Iso – *Isochrysis galbana*; Tet – *Tetraselmis suecica*

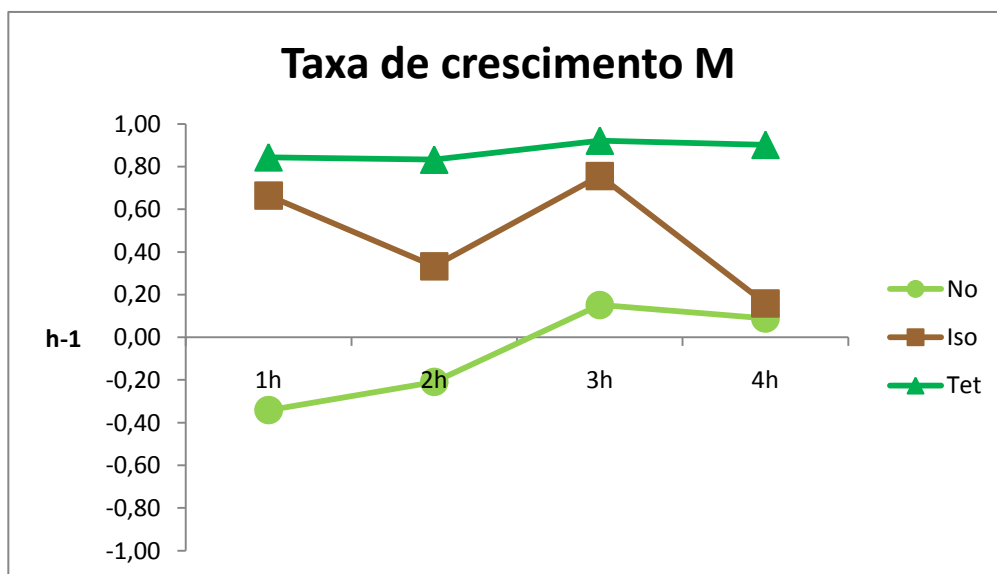


Figura 14 – Taxa de crescimento dos rotíferos para concentrações Médias, nas diferentes microalgas
No – *Nannochloropsis oculata*; Iso – *Isochrysis galbana*; Tet – *Tetraselmis suecica*

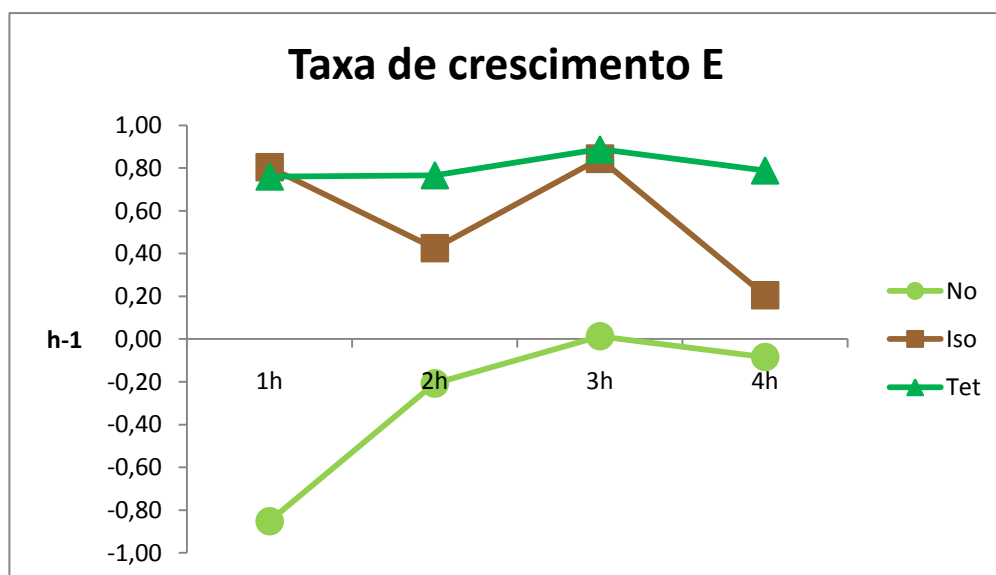


Figura 15 – Taxa de crescimento dos rotíferos para concentrações Elevadas, nas diferentes microalgas
No – *Nannochloropsis oculata*; Iso – *Isochrysis galbana*; Tet – *Tetraselmis suecica*

As taxas de filtração e herbivoria podem ser consideradas uma das medidas mais estreitamente relacionadas com os comportamentos alimentares dos organismos (Yúfera & Pascual, 1985). Nas figuras 16, 17 e 18 são analisadas as taxas de filtração e herbivoria nas diferentes concentrações das microalgas testadas. A taxa de herbivoria

em diferentes concentrações está compreendida no intervalo de 0 a 14 ind.ml.hr⁻¹; a taxa de filtração, por sua vez, tem um intervalo máximo dos 0 aos 2,5 ind.ml.hr⁻¹.

A observação da figura 15 mostrou que o maior valor de filtração com *Isochrysis galbana* foi atingido em concentrações mais baixas. Os valores das taxas de filtração de *I. galbana* e *T. suecica* diminuíram com o aumento da concentração de alga. Devido à dimensão das suas células, maiores que as células de *Nannochloropsis*, os rotíferos não careceram de uma grande concentração de alga para filtrarem o que necessitavam. Os valores das taxas de herbivoria atingidos por estas duas algas, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica*, estão próximos de zero. Apesar de as taxas de filtração dos rotíferos, alimentados com estas duas algas, terem valores inferiores a 1 ind.ml.h⁻¹, existe um aumento muito pequeno, mas gradual, da taxa de herbivoria, com o aumento da concentração, como seria de esperar (Montagnes et al 2001). No entanto, a duração do ensaio aliado à dimensão destas microalgas pode significar que maiores valores de herbivoria seriam atingidos se o ensaio tivesse uma maior duração.

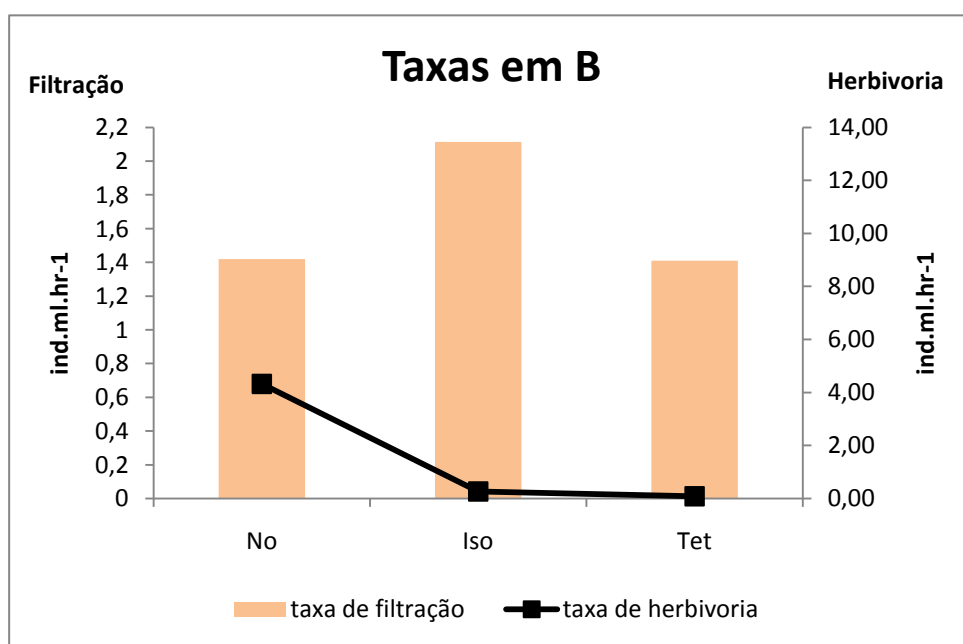


Figura 16 - Taxa de filtração e herbivoria em *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica*, para concentrações Baixas

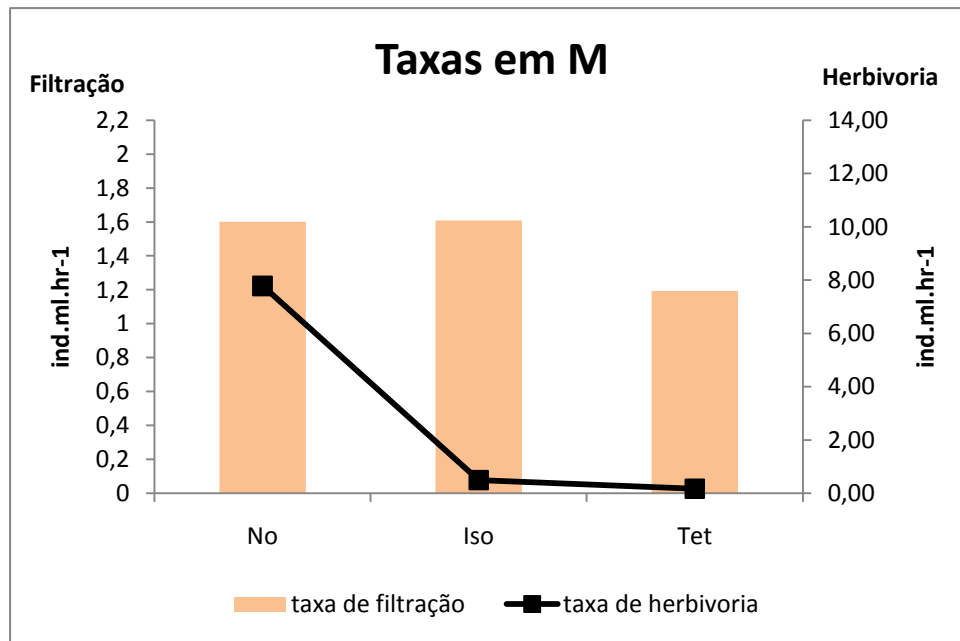


Figura 17 - Taxa de filtração e herbivoria em *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica*, para concentrações Médias

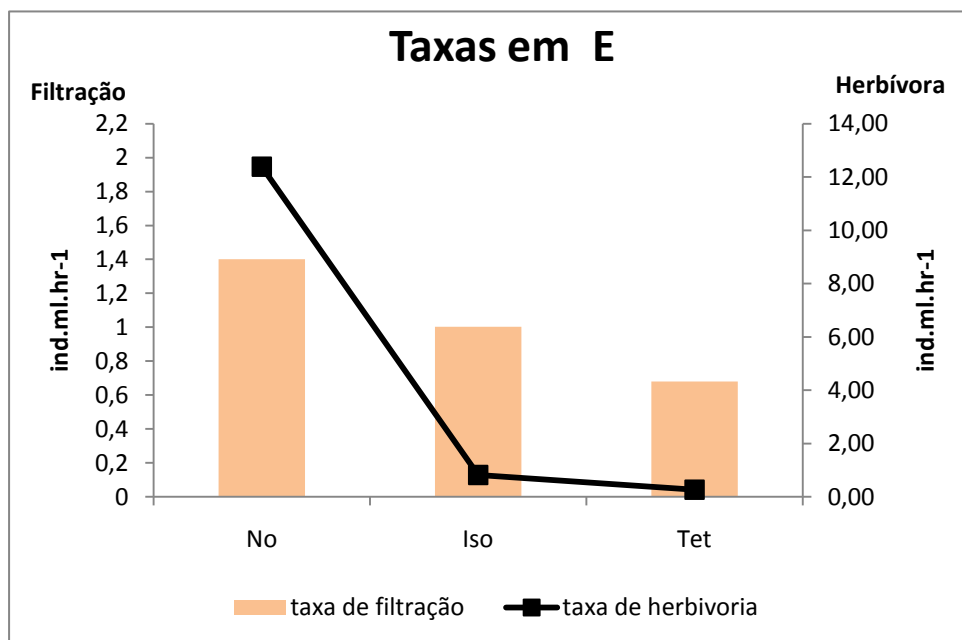


Figura 18 - Taxa de filtração e herbivoria em *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica*, para concentrações Elevadas

Nas figuras 16, 17 e 18 observa-se que a taxa de filtração dos rotíferos alimentados com *Nannochloropsis oculata* é constante, e seria de esperar que em maiores concentrações a taxa de filtração fosse maior. Apesar de isto não se verificar, observou-se um aumento da taxa de herbivoria com o aumento da concentração de *N. oculata*; esta tendência mostra que concentrações elevadas são mais vantajosas para os rotíferos (Lopes et al, 2010).

Estatisticamente a análise de variância ao efeito dos diferentes tratamentos na taxa de crescimento dos rotíferos para *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica* não apresentou valores significativos ($F=0,862$ $p=0,454$; $F=0,441$ $p=0,656$ e $F=2,126$ $p=0,175$ respectivamente).

Foi realizada uma análise da regressão linear dos grupos de controlo, para aferir se havia crescimento destas durante o período de tempo do ensaio. Esta regressão mostrou que o crescimento das diferentes microalgas não foi significativo (independentemente da concentração), durante o período de tempo do ensaio.

Foram também realizadas regressões lineares com o objectivo de analisar a existência de uma relação entre o aumento dos rotíferos e a diminuição do número de algas, (Anexos – Figuras 19 a 27). Todas as algas revelaram haver uma proporcionalidade inversa entre o consumo de algas e o aumento do número de rotíferos, como previsto. A quantidade de células de microalga diminuiu com o aumento do número de rotíferos.

5 – CONCLUSÃO

O presente estudo, que investigou os níveis de nutrição adequados para *Brachionus* sp., através de duas abordagens diferentes, a primeira virada para as taxas de crescimento e níveis de bioencapsulação de lípidos, e a segunda para as taxas de filtração e herbivoria, permitiu tirar as seguintes conclusões:

- ⇒ Os diferentes produtos experimentais usados nos ensaios 1 e 2 são adequados para o crescimento de *Brachionus* sp., e os resultados obtidos são comparáveis aos que se obtiveram com ω 3yeast60, utilizado como controlo (por ser um produto comercial comum).
- ⇒ Alguns dos produtos usados, como o selenium, obtiveram um maior número de rotíferos num período de tempo mais curto, Este composto é também um nutriente importante no desenvolvimento das larvas, como foi referido anteriormente.
- ⇒ No ensaio 1 A₁ (ω 3yeast60) permitiu aos rotíferos, alimentados por ela, uma maior incorporação dos ácidos gordos essenciais. Nenhuma das outras dietas permitiu níveis de incorporação tão elevados como a dieta comercial.
- ⇒ No ensaio 2 a dieta F (mistura de Ve-10+levedura de padeiro+óleo Algatrium) mostrou ser a mais completa, para os rotíferos; no entanto, a dieta E (mistura de Ve-10+levedura de padeiro+óleo Qrill), conseguiu valores próximos dos da dieta F para alguns ácidos gordos, o que significa que, com pequenas alterações, esta dieta possa vir a ser alterada para fornecer aos rotíferos todos os ácidos gordos que eles necessitam.

- ⇒ Os valores de ácidos gordos, considerados para os rotíferos alimentados com as diferentes dietas em ambos os ensaios, mostram que o produto comercial usado no Ipimar (ω 3yeast60) apresenta valores elevados de DHA, no entanto a dieta F, que possui Algatrium na sua constituição também apresenta valores elevados para este ácido gordo.
- ⇒ O produto ω 3yeast60 tem, como seria de esperar, melhor manuseio, e, visto ser um produto comercial pré-preparado, a sua elaboração envolveu menos trabalho e dispêndio de tempo.
- ⇒ O produto comercial Ve-10 mostrou ter elevada quantidade de 20:5n3, porém os rotíferos não conseguiram incorporar este ácido gordo, podendo este produto não ser adequado para a bioencapsulação de EPA. Por ser um produto experimental que induz taxas de crescimento semelhantes aos outros produtos analisados, nomeadamente o produto comercial, seria interessante proceder a modificações na sua composição, com vista a conseguir esta incorporação por parte dos rotíferos.
- ⇒ *Brachionus* sp. mostrou preferência por *Nannochloropsis oculata*, embora estes organismos também cresçam e se desenvolvam quando alimentados com outras microalgas
- ⇒ Observou-se através das taxas de filtração e herbivoria, que nas microalgas com partículas de maior dimensão (como *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica*), os rotíferos necessitam de concentrações Baixas das mesmas, podendo estes dados, permitir uma melhor utilização das microalgas no crescimento dos rotíferos.

Como em qualquer estudo científico, ao mesmo tempo que foram encontradas respostas para as questões colocadas, novas questões foram surgindo. Por este motivo, poderão colocar-se algumas problemáticas a abordar no seguimento deste trabalho. Em primeiro lugar, seria interessante observar o comportamento dos rotíferos, à exposição aos óleos de enriquecimento, durante diferentes períodos de tempo (mais e menos dias que os ensaios realizados). Em segundo lugar, as taxas de filtração e herbivoria foram realizadas num período de 4 horas. Seria também importante ver se as diferenças observadas num período maior de tempo seriam mais significativas, tendo em conta que aumentar o período de amostragem implicaria que as contagens não pudessem ser realizadas por uma só pessoa. Seria ainda interessante testar diferentes concentrações mais elevadas das microalgas utilizadas, para observar o comportamento das suas taxas de filtração e herbivoria. O trabalho foi, a nível pessoal, um tempo de amadurecimento científico e certamente intelectual. As rotinas de investigação prática juntaram-se a rotinas de estudo já adquiridas, permitindo um maior domínio de mais e melhores ferramentas para um trabalho futuro.

6 - ANEXOS

Regression, Conf. & Pred.

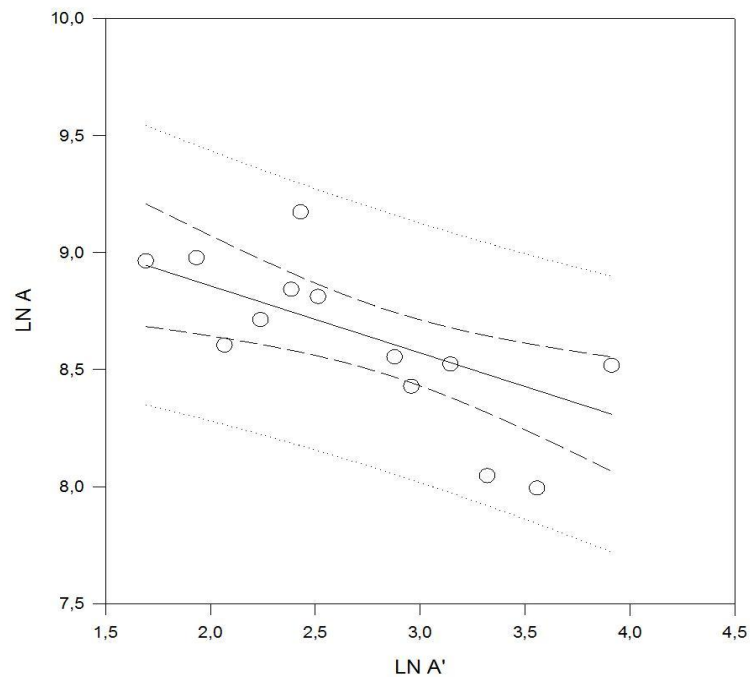


Figura 19 – recta de regressão para relacionar o número rotíferos com o número de partículas de *Nannochloropsis oculata* para concentrações Baixas

Regression, Conf. & Pred.

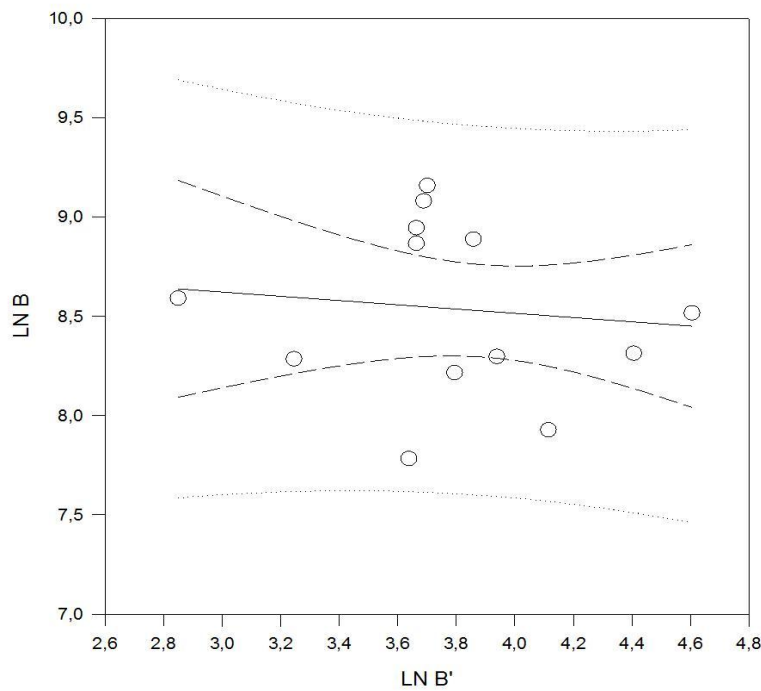
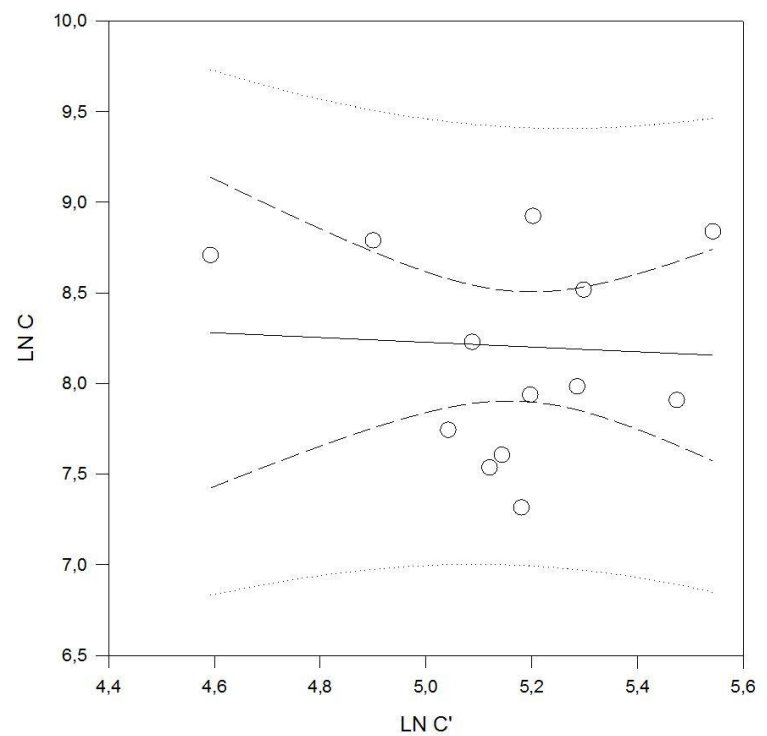


Figura 20 – recta de regressão para relacionar o número rotíferos com o número de partículas de *Nannochloropsis oculata* para concentrações Médias

Regression, Conf. & Pred.

Figura 21 – recta de regressão para relacionar o número rotíferos com o número de partículas de *Nannochloropsis oculata* para concentrações Elevadas



Regression, Conf. & Pred.

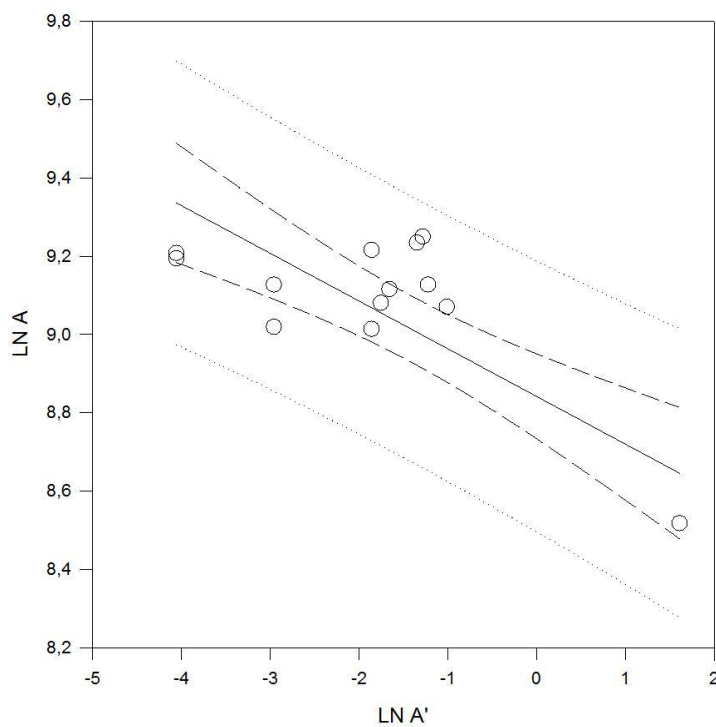


Figura 22 – recta de regressão para relacionar o número rotíferos com o número de partículas de *Isochrysis galbana* para concentrações Baixas

Regression, Conf. & Pred.

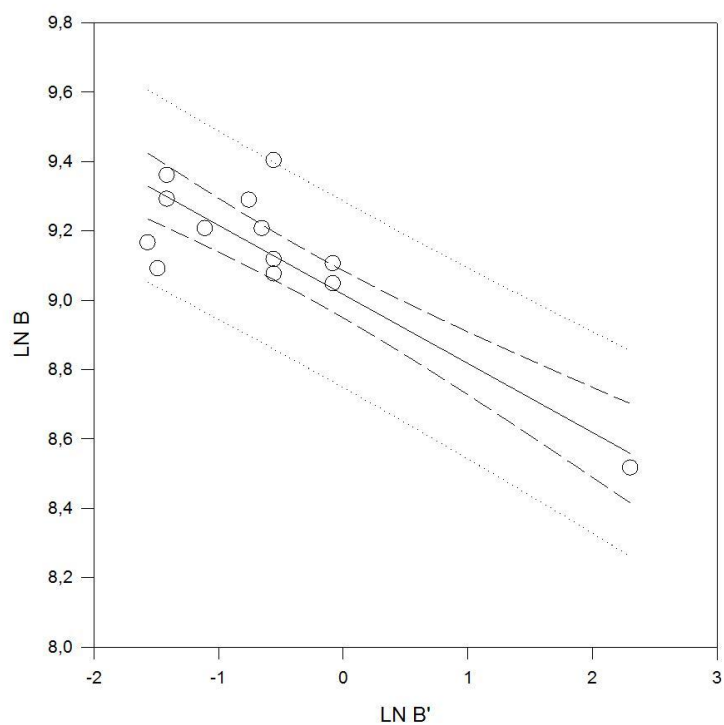


Figura 23 – recta de regressão para relacionar o número rotíferos com o número de partículas de *Isochrysis galbana* para concentrações Médias

Regression, Conf. & Pred.

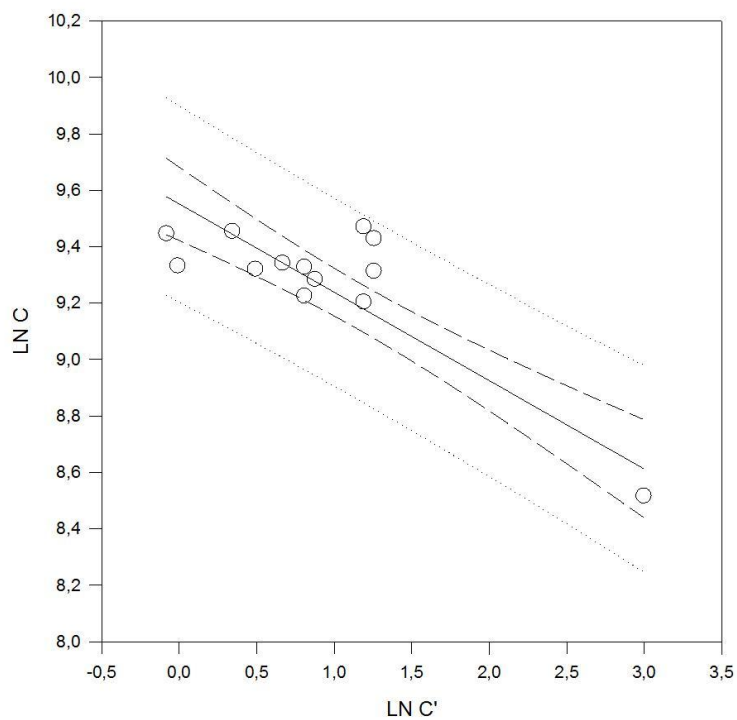


Figura 24 – recta de regressão para relacionar o número rotíferos com o número de partículas de *Isochrysis galbana* para concentrações Elevadas

Regression, Conf. & Pred.

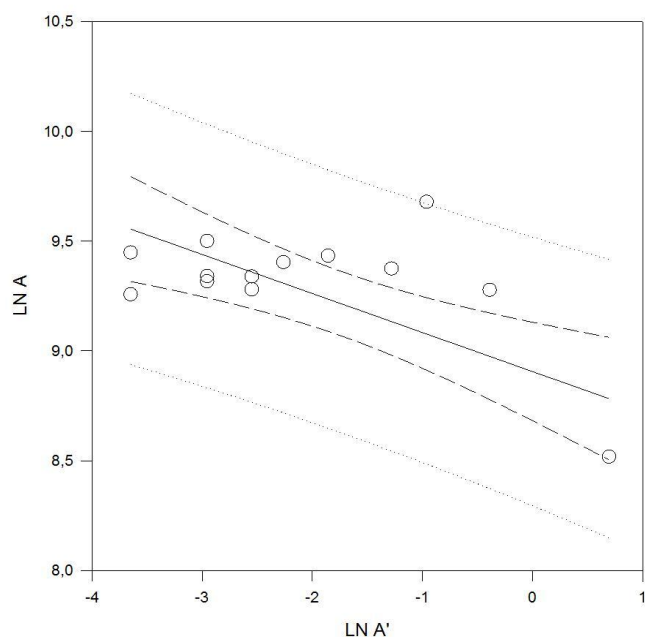


Figura 26 – recta de regressão para relacionar o número rotíferos com o número de partículas de *Tetraselmis suecica* para concentrações Médias

Regression, Conf. & Pred.

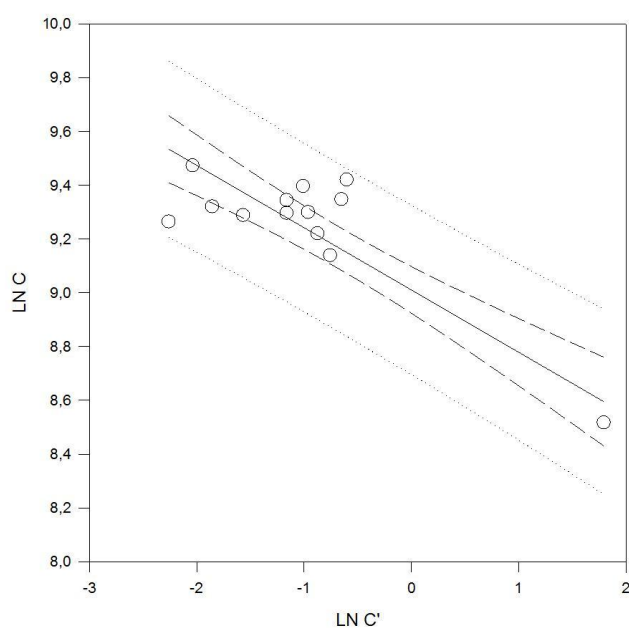


Figura 25 – recta de regressão para relacionar o número rotíferos com o número de partículas de *Tetraselmis suecica* para concentrações Baixas

Regression, Conf. & Pred.

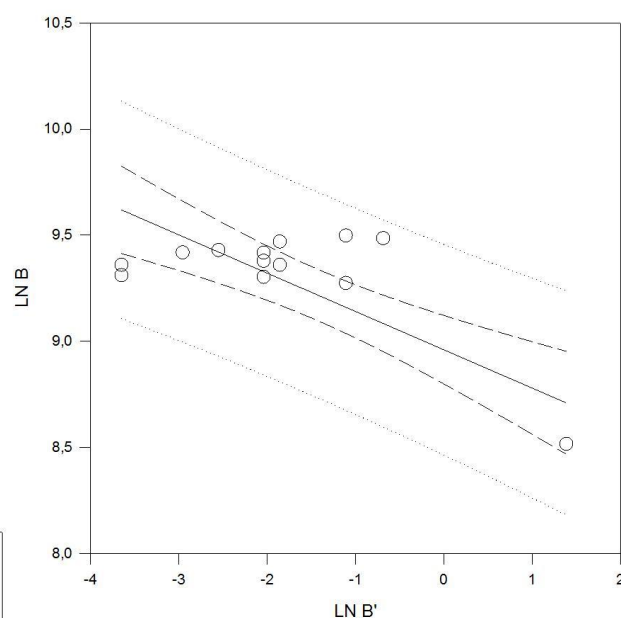


Figura 27 – recta de regressão para relacionar o número rotíferos com o número de partículas de *Tetraselmis suecica* para concentrações Elevadas

7 - BIBLIOGRAFIA

- Baer A., Langdon C., Mills S., Schulz C. & Hamre K. (2008) Particle size preference, gut filling and evacuation rates of the rotifer *Brachionus* "Cayman" using polystyrene latex beads. *Aquaculture* 282, 75–82.
- Bell, J.G., Castell, J.D., Tocher, D.R., MacDonald, F.M., Sargent, J.R., (1995). Effects of different arachidonic acid: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiol. Biochem.* 14, 139–151
- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estevez, A., Shields, R.J., Sargent, J.R. (2003) Optimising lipid nutrition in first feeding flatfish larvae. *Aquaculture* 227: 211-220
- Borowiczka, M. A., (1997). Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology* 9: 393-401
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., Dunstan, G. A., (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331.
- Brown, M. R., (2002). Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Avances en Nutrición Acuícola VI.. Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*
- Caric, M., Sanko-Njire, J., Skaramuca, B. (1993) Dietary effects of different feeds on the biochemical composition of the rotifer (*Brachionus plicatilis* Müller). *Aquaculture*, 53: 303-311
- Cejas JR., Almansa, E., Villamandos, JE., Badía, P., Bolaños, A., Lorenzo, A. 2003. Lipid and fatty acid composition of ovaries from wild fish and ovaries and eggs from captive fish of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture*, 216: 299-313.
- Conceição, L., E., C.; Yúfera, M.; Makridis, P.; Morais, S.; Dinis, M., T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing *Aquaculture Research* 41: 613-640
- Coutteau, P. (1996) Microalgae. In: Manual on the production and use of live food for aquaculture. Lavens, P. and Sorgeloos, P., (Eds). *FAO Fisheries Technical Paper*, 361: 7-48

- Dhert, P. (1996) Rotifers *In*: Manual on the production and use of live food for aquaculture. Lavens, P. and Sorgeloos, P., (Eds). *FAO Fisheries Technical Paper*, 361
- Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G., Sorgeloos, P. (2001) Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture* 200: 129-146
- Enright, C. T., Newkirk, G. F., Craigie, J. S., Castell, J. D. (1986a) Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros calcitrans* Schütt of varied chemical composition *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96: 15–26
- FAO, (2009). The State of World Fisheries and Aquaculture 2008.
- Fernandez-Reiriz, U., Labarta M., Ferreiro, J. (1993) Effects of commercial enrichment diets on the nutritional value of the rotifer (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 112: 195–206
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., Falkowski, P. (1998) Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* 281: 237-240p
- Frost B. W. (1972) Effects of size concentration of food particles on food behavior of the marine planktonic copepod *Calanus pacific*. *Limnology and Oceanography*, 805-815p.
- Graham, L. E. & Wilcox, L. W. (2000) Phytoplankton Ecology *In*: *Algae*. Prentice-hall, U.S.A 22: 544-604
- Hamre K., Mollan T.A., Sæle Ø., Erstad B. (2008) Rotifers enriched with iodine and selenium increase survival in Atlantic (*Gadus morhua*) cod larvae. *Aquaculture* 284, 190–195.
- Hamre K., Srivastava A., Rønnestad I., Mangor-Jensen A. & Stoss J. (2008) Several micronutrients in the rotifer *Brachionus* sp may not fulfil the nutritional requirements of marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 14, 51–60.
- Hansen, B., Wernberg-Møller, T., Wittrup, L. (1997) Particle grazing efficiency and specific growth of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 215, 217–233.
- Ibeas, C., Cepas, J. R., Fores, R., Badia, P., Gómez, T., Lorenzo Hemández, A. (1997) Influence of eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid ratio (EPA/DHA) of

- dietary lipids on growth and fatty acid composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* 150: 91-102
- Kaiser, M. et al (2005), *Aquaculture In: Marine Ecology Processes, Systems, and Impacts. Oxford* 13: 430-456.
- Kostopoulou, V.; Miliou, H.; Katis, G.; Verriopoulos, G. (2006) Changes in the population structure of the lineage 'Nevada' belonging to the *Brachionus plicatilis* species complex, batch-cultured under different feeding regimes. *Aquaculture International*, 14, .451-466,
- Lopes, A., Castanho, S., Mendes, A., Brotas, V., Pousão-Ferreira, P. (2010) Feeding behavior of *Brachionus* sp.: filtration and grazing rates with different microalgae. *Seafarming tomorrow – European Aquaculture Conference*.
- Lubzens, E., and Zmora, O., (2003). Production and Nutricional value of Rotifers In: Live feeds in aquaculture. Støttrup, J., G. and McEvoy, L., A., (Eds) *Blackwell Science*. 17-64p
- Lubzens, E., Tandler, A., Minkoff, G. (1989) Rotifers as food in aquaculture. *Hydrobiologia*, 17: 245-255
- Montagnes, D.J.S., Kimmance S.A., Tsounis, G., Gumbs, J.C., (2001) Combined effect of temperature and food concentration on the grazing rate of *Brachionus plicatilis*. *Marine Biology* 139: 975-979p
- Muller-Feuga et al., (2003) The microalgae of aquaculture In: Live feeds in aquaculture. Støttrup, J., G. and McEvoy, L., A., (Eds) *Blackwell Science* 206-253p
- Muller-Feuga, A., (2000) The role of microalgae in aquaculture: situations and trends. *Journal of Applied Phycology* 12: 527-534p
- Omori, M.; Ikeda, T. (1984) Methods in marine zooplankton ecology. *Wiley: New York*, 332p.
- Park, S., Kazlauskas, R., J. (2001) Improved Preparation and Use of Room-Temperature Ionic Liquids in Lipase-Catalyzed Enantio – and Refioselective Acylations. *American Chemical Society*, 66: 8395-8401
- Penglase, S., Hamre, K., Sweetman, J. W., Nordgreen, A. (2010) A new method to increase and maintain the concentration of selenium in rotifers (*Brachionus* spp.) *Aquaculture* – accepted manuscript

- Pousão-Ferreira, P., (2009). Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. *Ipimar*. ISSN: 1647-1504 35-163p.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I. & Olsen, Y. (1997) The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155, 103–115.
- Sargent, J.R.; McEvoy, L. A.; Bell, J. G. (1997) Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155: 117-127
- Teshima, S., Kanazawa, A., Horinouchi, K., Yamasaki, S., Hirata, H. (1987) Phospholipids of the rotifer, prawn and larval fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53, 609– 615.
- Tocher, D.R., Sargent, J.R. (1984) Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes from some northwest European marine fish. *Lipids* 19, 492– 499
- Walford J. & Lam T.J. (1987) Effects of feeding with microcapsules on the content of essential fatty acids in live foods for the larvae of marine fishes. *Aquaculture* 61, 219–229.
- Yúfera, M. and Pascual, E. (1985). Effects of algal food concentration on feeding and ingestion rates of *Brachionus plicatilia* in mass culture. *Hydrobiologia*, 122(2) 181-187
- Yúfera, M.(2001) Studies on *Brachionus* (Rotifera): an example of interaction between fundamental and applied research. *Hydrobiologia* 446-447: 383-392.